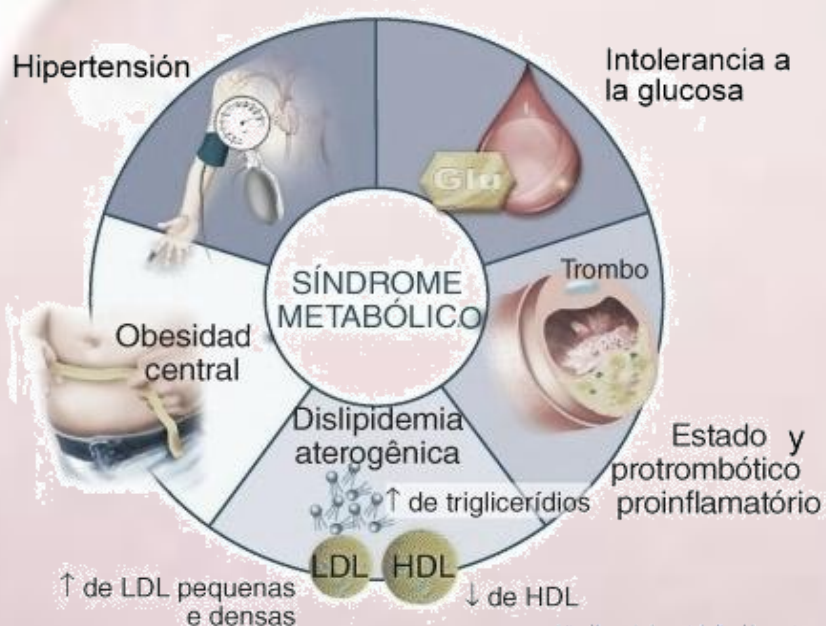
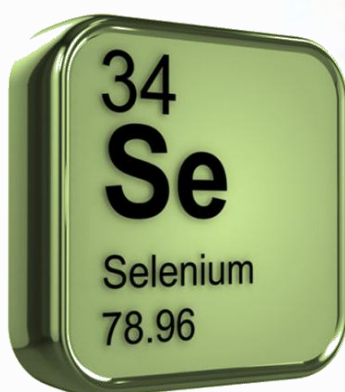


TESIS DOCTORAL

IMPLICACIÓN DEL SELENIO EN LA PROGRAMACIÓN DEL SÍNDROME METABÓLICO



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA
PROGRAMA DE DOCTORADO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOMEDICINA



TESIS DOCTORAL

IMPLICACIÓN DEL SELENIO EN LA PROGRAMACIÓN DEL SÍNDROME METABÓLICO

Paulina Muñoz del Valle

Directoras:

Dra. M^a Luisa Ojeda Murillo

Dra. Fátima Nogales Bueno

Sevilla, 2016



Dra. Dña. M^a Luisa Ojeda Murillo, Profesora Titular de Fisiología de la Universidad de Sevilla y Dra. Dña. Fátima Nogales Bueno, Profesora Contratada Doctora de Fisiología de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICAN: que la tesis doctoral con el título: “IMPLICACIÓN DEL SELENIO EN LA PROGRAMACIÓN DEL SÍNDROME METABÓLICO”, presentada por la Lda. Paulina Muñoz del Valle, para optar al grado de Doctora por la Universidad de Sevilla, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de fisiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, reuniendo los requisitos exigidos.

Y para que así conste, en el cumplimiento de las disposiciones vigentes, extendemos el presente, en Sevilla a trece de Mayo de dos mil dieciséis.

Prof. Dra.

Dña. M^a Luisa Ojeda Murillo

Prof. Dra.

Dña. Fátima Nogales Bueno

Doctorando

Dña. Paulina Muñoz del Valle

A mi madre, por su ánimo constante;

A mi marido, por su apoyo incondicional;

A ambos, por su gran amor.

Son muchas las personas que forman parte de esta tesis y a las que estoy agradecida.

Comienzo nombrando a la doctora M^a Luisa Murillo Taravillo, quien tanto cariño y tantas horas dedicó a explicarme las bases de la Fisiología, animándome siempre a continuar estudiando sobre ella.

Continúo con una de las primeras personas que en 2011 me dijo que yo podría hacerlo: la Catedrática Olimpia Carreras Sánchez. Gracias por invitarme a trabajar en su equipo, y encender la chispa en mí para continuar mis estudios.

Mil gracias, y no son suficientes, a mis directoras de tesis, las doctoras M^a Luisa Ojeda Murillo y Fátima Nogales Bueno, mis grandes guías, profesoras, “jefas”, colaboradoras, animadoras y amigas. Gracias por seguir creyendo en mí, a pesar de mis debilidades y las dificultades encontradas en el camino.

Gracias a los alumnos internos y compañeros del grupo “Ácido fólico y alcohol”. Son muchos los que han pasado por allí estos años, y todos han colaborado y ayudado para que hoy pueda dar por terminado este trabajo. Especialmente a Karick, María y Rui, doctorandos más veteranos que yo, por enseñarme lo que sabían para manejarme con los equipos y técnicas, y por los ratos de conversación compartidos.

Gracias a aquéllos que pasaron por el Departamento de Fisiología a la vez que yo, de un grupo u otro, que han compartido conmigo equipos, espacio y charlas, y a los que pasaron antes, dejando su trabajo y conocimiento al servicio del equipo.

No puedo terminar sin agradecer a mis compañeros de trabajo que han vivido mi estrés y duplicidad de trabajo durante estos años.

Por último, gracias a mi familia, orgullosa siempre de que decidiera continuar los estudios para ser doctora.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS UTILIZADAS

ADP: Adenosin difosfato	HDL: Lipoproteína de alta densidad
AGE: Ácidos grasos esenciales	HOMA-IR: Modelo homeostático de evaluación de RI
AGL: Ácidos grasos libres	HTA: Hipertensión arterial
Akt: Proteína quinasa B (similar a PKB)	IDF: Federación Internacional de Diabetes
AMP: Adenosina monofosfato	IF: Índice de fertilidad
AMPK: Proteína quinasa adenosina monofosfato	IG: Índice de gestación
AMPKt: AMPK total	IL-6: Interleukina 6
ATP: Adenosin trifosfato	IMC: Índice de masa corporal
C.D.A.: Coeficiente de digestibilidad aparente	iNOS: Óxido nítrico sintetasa inducible
CAT: Catalasa	INV: Índice de nacidos vivos
CK: Citokinas	IOS: Índice organosomático
Cys: Cisteína	IR: Receptor de insulina
DIO: Iodotironina deiodinasa	IRS: Sustrato del receptor de insulina
DM2: Diabetes Mellitus tipo 2	IS: Índice de supervivencia lactante
EC-SOD: Enzima superóxido dismutasa del medio extracelular	IV: Índice de viabilidad
eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial	JNK: Quinasa c-jun N terminal
EO: Estrés oxidativo	KHK: Ketohexokinasa
ERK: Quinasas reguladas por señales extracelulares	LDL: Lipoproteína de baja densidad
GLUT: Transportador de glucosa	LKB1: Quinasa serina-treonina B1 de hígado
GPx: Glutation peroxidasa	MAP: Proteína quinasas activadas por mitógenos
GR: Glutation reductasa	MDA: Malondialdehído
GRB2: Factor de crecimiento proteína de unión al receptor 2	mTOR: Células diana de rapamicina en mamíferos
GSH: Glutation	mUI: Miliunidades internaciones
GSSG: Glutation disulfuro	NADP: Nicotinamín adenín fosfato
H₂O₂: Peróxido de hidrógeno	NADPH: Nicotinamín adenín fosfato reducido
	NFkB: Factor nuclear kappa B

NFL:	Bucle de retroalimentación negativa	RI:	Resistencia a la insulina
NO:	Óxido nítrico	ROS:	Especies reactivas de oxígeno
Nox:	Enzima NAD(P)H oxidasa	S6K:	Quinasa de ribosoma S6
NOX:	Óxido nítrico sintasa	SDS:	Dodecil sulfato de sodio
O₂⁻:	Anión superóxido	Se:	Selenio
OH•:	Radical hidroxilo	SeIP:	Selenoproteína P
OMS:	Organización Mundial de la Salud	Ser:	Serina
PAI-1:	Inhibidor del activador del plasminógeno 1	SM:	Síndrome metabólico
p-AMPK:	AMPK fosforilada	SNS:	Sistema nervioso simpático
PCR:	Proteína C reactiva	SOCS:	Factores inhibidores de la señal de citocinas
PDK1:	Quinasa dependiente de PIP3	SOD:	Superóxido dismutasa
PI3K:	Fosfatidilinositol 3-quinasa	TG:	Triglicéridos
PIP2:	Fosfatidilinositol-3,4-difosfato	Thr:	Treonina
PIP3:	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato	TNF- :	Factor de necrosis tumoral
PKB:	Proteína quinasa B	TPK:	Tampón fosfato potásico
PKC:	Proteína quinasa C	TrxR:	Tiorredoxina reductasa
PP1:	Proteína fosfato 1	TSC1:	Complejo de esclerosis tuberosa 1
PTEN:	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa	TSC2:	Complejo de esclerosis tuberosa 2
PTP1B:	Proteína tirosina fosfatasa 1 B	Tyr:	Tirosina
RAS:	Proteína G monomérica	VLDL:	Lipoproteína de muy baja densidad
RE:	Retículo endoplasmático	XO:	Xantina oxidasa

LISTA DE TABLAS

Lista de Tablas

	Página
Tabla 2.5. Principales selenoproteínas con actividad antioxidante presentes en el organismo	36
Tabla 4.1.2.1. Composición general de la dieta básica.....	57
Tabla 4.1.2.2. Composición del corrector vitamínico (mg/kg o UI/kg) o mineral (mg/kg) de la dieta.....	58
Tabla 4.1.3.3. Índices gestacionales y de supervivencia.....	60
Tabla 6.3.1. Características de los anticuerpos usados.....	76
Tabla 4.6.3.2. Componentes empleados en los geles.....	78
Tabla 4.7.1. Significación utilizada.....	82
Tabla 5.1.1. Control nutricional de las madres.....	87
Tabla 5.1.2.1. Estado nutricional de las madres.....	88
Tabla 5.1.2.2. Índice organosomático (IOS) en madres al final de la lactancia (%).....	89
Tabla 5.1.3. Perfil lipídico y glucídico en madres al final de la lactancia.....	90
Tabla 5.1.4. Presión arterial y frecuencia cardíaca de madres al final de la lactancia.	91
Tabla 5.1.5. Parámetros gestacionales y de supervivencia.....	92
Tabla 5.2.1. Balance de Selenio en madres al final de la lactancia.....	93
Tabla 5.3.1.1. Estado nutricional y parámetros morfológicos de las crías al nacer. .	101
Tabla 5.3.1.2. Índice organosomático (IOS) en crías de 21 días (%) según sexos ...	103
Tabla 5.3.2. Perfil lipídico y glucídico en crías al final de la lactancia.....	104
Tabla 5.4.1. Balance de Selenio en crías de 21 días.....	105

LISTA DE FIGURAS

Lista de Figuras

	Página
Figura 2.2.3. Actuación de las enzimas del sistema de defensa antioxidante más importante del organismo.....	12
Figura 2.2.4. Relación entre las ROS y los factores implicados en el SM.....	14
Figura 2.3. Múltiples funciones de la insulina.....	18
Figura 2.3.3. Receptor de insulina.....	21
Figura 2.3.4.1. Vía de señalización de la insulina.....	23
Figura 2.3.4.2. Inhibición de la vía de señalización de la insulina por PTEN y PTP1B.....	24
Figura 2.3.4.3. Mecanismos de inhibición de la cascada de insulina durante la obesidad y la diabetes tipo 2.....	26
Figura 2.3.6.1. Representación de la estructura de las subunidades del AMPK y su fosforilación.....	27
Figura. 2.3.6.2. Representación esquemática de la vía mTOR inducida por la insulina, incluyendo la inducción AMPK IRS-dependiente.....	30
Figura 2.4.4. Principales selenoproteínas y sus funciones.....	35
Figura 2.6. Posibles mecanismos que relacionan las selenoproteínas y selenocompuestos con la cascada de señalización de la insulina.....	38
Figura 2.7.1. Metabolismo de la glucosa y fructosa.....	41
Figura 2.7.2. Efectos de ingesta elevada de fructosa.....	43
Figura 4.1.1.1. Diseño experimental.....	56
Figura 4.8. Resumen del apartado Material y Métodos.....	83
Figura 5.1.2. Parámetros morfológicos de madres al final de la lactancia: IMC (Kg/m ²) y circunferencias torácica y abdominal (cm).....	88
Figura 5.2.2. Concentración de Se en órganos de madres (µg/ g tejido seco)	94

Figura 5.2.3.1. Actividad hepática de la SOD y CAT en madres lactantes.....	97
Figura 5.2.3.2. Actividad hepática de la GPx y la GR en madres lactantes. Ratio GR/GPx.....	98
Figura 5.2.3.3. Niveles de oxidación de lípidos (MDA) y de proteínas (Grupos Carbonilos) en hígado de madres lactantes.....	100
Figura 5.3.1.1. Parámetros morfológicos de las crías de 21 días por sexo.....	102
Figura 5.3.1.2. Circunferencia torácica y abdominal de crías de 21 días por sexo ...	103
Figura 5.4.2.1. Concentración de Selenio en suero de crías de 21 días por sexo (ng/mL)	105
Figura 5.4.2.2. Concentración de Se en órganos de crías de 21 días (µg/g tejido seco).....	106
Figura 5.4.2.3. Concentración de Se en órganos de crías de 21 días (µg/ g tejido seco).....	107
Figura 5.5.1. Expresión de selenoproteínas GPx1, GPx4 y SelP en hígado de crías de 21 días por sexos.....	110
Figura 5.5.2. Ratio de la expresión de las selenoproteínas GPx1, GPx4 y SelP con la concentración de Se en hígado de crías de 21 días por sexos.....	113
Figura 5.6.1.1. Actividad hepática de la SOD y la CAT en crías de 21 días	115
Figura 5.6.1.2. Actividad hepática de la GPx y la GR en crías de 21 días. Ratio GR/GPx	116
Figura 5.6.2. Niveles de oxidación de lípidos (MDA) y de proteínas (Grupos Carbonilos) en hígado de crías de 21 días.....	117
Figura 5.7. Expresión de la proteína AMPK total y fosforilada en hígado de cría de 21 días por sexos. Ratio	119
Figura 5.8.1. Expresión de proteína IRS-1 hepática de crías de 21 días.....	121
Figura 5.8.2. Acción propuesta de la GPx y SelP sobre la cascada de señalización de la insulina a tenor de los resultados obtenidos en esta Tesis.....	122

ÍNDICE

ÍNDICE

	Página
1. RESUMEN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	5
2.1. <u>El Síndrome Metabólico</u>	5
2.1.1. El Síndrome Metabólico en el embarazo.....	7
2.1.2. El Síndrome Metabólico durante la lactancia.....	8
2.1.3. El Síndrome Metabólico en pediatría	9
2.2. <u>Síndrome Metabólico y Estrés Oxidativo</u>	10
2.2.1. Estrés oxidativo.....	10
2.2.2. Especies reactivas de oxígeno.....	10
2.2.3. Sistemas de defensa antioxidantes.....	11
2.2.4. Relación entre estrés oxidativo y Síndrome Metabólico	13
2.2.4.1. Estrés oxidativo y Resistencia a la Insulina.....	14
2.2.4.2. Estrés oxidativo y obesidad	15
2.2.4.3. Estrés oxidativo e hipertensión	15
2.2.4.4. Estrés oxidativo y dislipidemia	16
2.2.4.5. Estrés oxidativo e hiperglucemia	16
2.3. <u>Síndrome Metabólico y Resistencia a la Insulina</u>	17
2.3.1. Cuantificación de la Resistencia a la Insulina.....	19
2.3.2. Consecuencias de la Resistencia a la Insulina en los tejidos	20
2.3.3. Sustrato del Receptor de Insulina (IRS)	21
2.3.4. Cascada de señalización de la insulina.....	22
2.3.5. Relación del IRS con la Resistencia a la Insulina.....	24

	Página
2.3.6. Proteína Quinasa Activada por adenosin monofosfato(AMPK) y su relación con la Resistencia al Insulina y el Síndrome Metabólico	27
2.4. <u>Selenio y selenoproteínas</u>	30
2.4.1. Glutation peroxidasas	32
2.4.2. Tiorredoxina reductasa	33
2.4.3. Iodotironina deiodinasa	33
2.4.4. Selenoproteína P	34
2.5. <u>Selenio y Estrés Oxidativo</u>	35
2.6. <u>Selenio, Síndrome Metabólico y Resistencia a la Insulina</u>	37
2.7. <u>La inducción del Síndrome Metabólico con la ingesta de una dieta rica en fructosa</u>	40
2.8. <u>Programación metabólica fetal</u>	44
3. OBJETIVO	51
4. MATERIAL Y MÉTODOS	55
4.1. <u>Animales de experimentación</u>	55
4.1.1. Esquema del diseño experimental	56
4.1.2. Dietas utilizadas	57
4.1.3. Determinación de parámetros nutricionales (Análisis de los factores de riesgo relacionados con el Síndrome Metabólico	59
4.1.3.1. Estudio nutricional y de la ingesta de selenio.....	59
4.1.3.2. Parámetros morfológicos	59
4.1.3.3. Parámetros gestacionales	60
4.1.3.4. Determinación del perfil lipídico y glucídico.....	60
4.1.3.5. Determinación de la insulina y cálculo HOMAR	61

	Página
4.1.3.6. Determinación de la presión arterial y frecuencia cardíaca	62
4.2. <u>Toma y procesamiento de las muestras</u>	62
4.2.1. Obtención y tratamiento de las muestras de orina y heces	62
4.2.2. Obtención y tratamiento de las muestras de leche	62
4.2.3. Obtención y tratamiento de las muestras de suero.....	63
4.2.4. Obtención y tratamiento de los distintos órganos	63
4.3. <u>Determinación analítica del selenio</u>	63
4.4. <u>Estudio de índices biológicos</u>	64
4.5. <u>Determinación de la actividad antioxidante y la oxidación en hígado</u>	64
4.5.1. Homogenización hepática para determinar enzimas antioxidantes.....	64
4.5.2. Determinación de la concentración total de proteínas	65
4.5.3. Determinación de la actividad de la Glutathion Peroxidasa	66
4.5.4. Determinación de la actividad de la Glutathion Reductasa.....	68
4.5.5. Determinación de la actividad de la Superóxido dismutasa.....	69
4.5.6. Determinación de la actividad de la Catalasa.....	71
4.5.7. Determinación de la peroxidación lipídica	72
4.5.8. Determinación de la oxidación de proteínas.....	73
4.6. <u>Análisis de la expresión de proteínas hepáticas</u>	75
4.6.1. Homogenización hepática para Western Blotting	75
4.6.2. Características generales de los anticuerpos	75
4.6.3. Electroforesis en gel e poliacrilamida con SDS: SDS-PAGE	76
4.6.4. Transferencia de proteínas	79
4.6.5. Inmunodetección.....	79

	Página
4.6.6. Revelado.....	80
4.7. <u>Tratamiento estadístico de datos</u>	81
4.8. <u>Esquema resumen de material y métodos</u>	83
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	87
5.1. <u>Análisis nutricional, morfológico y metabólico en madres lactantes</u>	87
5.1.1. Control nutricional	87
5.1.2. Valoración morfológica.....	88
5.1.3. Análisis del metabolismo lipídico y glucídico	90
5.1.4. Presión arterial y frecuencia cardíaca	90
5.1.5. Caracterización de parámetros gestacionales y de supervivencia	92
5.2. <u>Distribución de selenio en madres lactantes</u>	92
5.2.1. Balance de selenio.....	92
5.2.2. Distribución tisular de selenio.....	93
5.2.3. Balance oxidativo hepático.....	96
5.3. <u>Análisis nutricional, morfológico y metabólico en crías</u>	100
5.3.1. Estado nutricional y parámetros morfológicos	100
5.3.2. Análisis del metabolismo lipídico y glucídico	104
5.4. <u>Distribución de selenio en crías lactantes</u>	104
5.4.1. Balance de selenio.....	104
5.4.2. Depósitos tisulares de selenio.....	105
5.5. <u>Expresión de las selenoproteínas hepáticas en crías</u>	109
5.5.1. Expresión de las selenoproteínas hepáticas	109
5.5.2. Relación de las selenoproteínas con los depósitos hepáticos de selenio	112

	Página
5.6. <u>Estudio de las actividad antioxidante en hígado de crías lactantes</u>	113
5.6.1. Actividad enzimática antioxidante.....	114
5.6.2. Niveles de oxidación de lípidos y proteínas.....	117
5.7. <u>Expresión de la proteína AMPK total y fosforilada en hígado de crías</u>	118
5.8. <u>Expresión del IRS-1 de crías</u>	120
6. CONCLUSIONES	125
7. BIBLIOGRAFÍA	129

RESUMEN

1. RESUMEN

El selenio (Se) es un mineral traza esencial para la vida que actúa fisiológicamente a través de las selenoproteínas. Entre otras acciones, la selenoproteína endógena antioxidante glutatión peroxidasa (GPx) y la transportadora de Se en sangre, selenoproteína P (SelP), parecen tener un papel importante en el síndrome metabólico (SM) por debilitar la cascada de señalización de la insulina mediante diferentes mecanismos.

El SM es una alteración lipídica y glucídica asociada a complicaciones cardiovasculares que afecta a las mujeres embarazadas y a sus hijos, incluso en la edad adulta, pues parece alterar la programación metabólica de la descendencia.

Para evaluar la posible implicación del Se y las selenoproteínas en madres y en la transmisión de esta patología a su progenie, se analizaron los depósitos de Se tisulares y en leche materna, su absorción aparente y retención, así como los parámetros metabólicos, la presión arterial y la actividad antioxidante hepática, en madres sometidas a una dieta rica en fructosa (65%) con un contenido de Se normal (0.1 ppm) durante la gestación y lactancia.

En las crías, separadas por sexo, además, se determinó la expresión de las selenoproteínas GPx1, GPx4 y SelP en relación con el balance oxidativo y la cascada de señalización de la insulina, analizando la activación del AMPK y la expresión de IRS-1.

Los resultados muestran que la concentración de Se en madres y crías expuestas a una dieta rica en fructosa varía según el tejido aunque en suero es constante, encontrándose tejidos deplecionados como el corazón, y replecionados como el hígado o riñón.

Las crías hembras muestran un perfil más parecido al maternal respecto a los depósitos de Se y a la actividad antioxidante, así como mayor oxidación lipídica hepática, y menores valores de insulina en suero. Respecto a la expresión de selenoproteínas, las crías hembras mostraron mayores niveles de GPx1 y SelP, y menor activación de AMPK y niveles de IRS-1 hepáticos.

Los machos y las hembras presentaron valores elevados de GPx4 en el hígado. Así, parece existir una relación directa entre Se-selenoproteínas-metabolismo especialmente en hembras al final de la lactancia.

ANTECEDENTES

2. ANTECEDENTES

2.1. EL SÍNDROME METABÓLICO

El SM, conocido también como síndrome plurimetabólico, síndrome de resistencia a la insulina o síndrome X, se considera un conjunto de alteraciones metabólicas y cardiovasculares que están relacionadas con la resistencia a la insulina (RI) y la obesidad abdominal y que predisponen al desarrollo de aterosclerosis y de enfermedades cardiovasculares, la principal causa de mortalidad en los países desarrollados (Day 2007).

Actualmente, la prevalencia del SM en España es del 31% de la población, siendo algo menor en mujeres que en hombres (Fernández Bergé y cols., 2012). En los últimos años ha aumentado, ya que estudios anteriores basados en datos de 2008 a 2010, establecían la prevalencia del SM en la población española en un 22,7% (Guallar-Castillón y cols., 2013). Además, esta prevalencia va aumentando progresivamente en ambos sexos con la edad, aunque en el caso de las mujeres a partir de los 55 años es más frecuente la presencia de SM (52,5%) que en los hombres (42,2%).

Teniendo en cuenta estos datos, se evidencia la importancia del estudio y diagnóstico precoz del SM, ya que se ha demostrado que las personas que lo padecen tienen un riesgo cinco veces mayor de sufrir diabetes tipo 2, tres veces mayor de sufrir un infarto de miocardio o un derrame cerebral y un riesgo dos veces mayor de morir a causa de un evento de este tipo, en comparación con las personas que no lo padecen (International Diabetes Federation, 2006).

Existen varias definiciones para este trastorno, que facilitan su diagnóstico. La primera definición la presentó la OMS (1999), describiendo el SM por la presencia de *Diabetes Mellitus*, tolerancia anormal a la glucosa, glucemia en ayunas ≥ 110 mg/dL o RI, unidos a dos de los siguientes criterios:

- Hipertensión $\geq 140/90$ mmHg
- Obesidad: Índice Cintura/Cadera > 0.90 en hombres y > 0.85 en mujeres. Índice de Masa Corporal (IMC) > 30 Kg/m²

- Dislipemia: Triglicéridos (TG) > 150 mg/dL. Colesterol HDL (HDL-C) < 35 mg/dL en hombres y < 39 mg/dL en mujeres
- Microalbuminuria: Coeficiente albúmina/creatinina > 30 mg/g. Excreción urinaria de albumina 20-199 mg/min

Sin embargo, estos criterios se revisaron en 2001 por el Grupo Europeo para el Estudio de la Resistencia a la Insulina y el III Panel Estadounidense para el Tratamiento de Adultos del Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol (ATP III), dando lugar a una nueva definición de SM, que sería diagnosticado si se encuentra un incremento del 25% de los valores de insulina en ayunas en los individuos no diabéticos, y dos o más de los siguientes criterios:

- Obesidad central: diámetro de cintura 94 cm en hombres, 80 cm en mujeres
- Dislipidemia: TG 175 mg/dL y/o HDL-C < 1 mmol/L; o ser tratado por dislipidemia
- Hipertensión: presión arterial 140/90 mmHg; o estar bajo tratamiento antihipertensivo
- Hemoglobina Glicosilada 6,1 mmol/L

Tras ser sometida a revisión también esta definición, en la actualidad se considera ampliamente aceptada la publicada por la International Diabetes Federation (IDF) en 2006. Esta describe el SM por la presencia de obesidad central, establecida por un IMC 30 Kg/m². En el caso de que este parámetro fuera menor, se tiene en cuenta un diámetro de cintura 94 cm en hombres o 80 cm en mujeres para diagnosticarlo. Además, esta obesidad central debe estar unida a dos o más de los siguientes rasgos para establecer el SM:

- TG: 150 mg/dL; o seguir un tratamiento específico para la hipertrigliceridemia
- Nivel bajo de HDL-C: < 40 mg/dL en hombres y < 50 mg/dL en mujeres; o seguir un tratamiento específico para la hipercolesterolemia

- Hipertensión: presión arterial 130/85 mmHg; o seguir un tratamiento para una hipertensión previamente diagnosticada
- Alto nivel de glucosa en plasma en ayunas: 100 mg/dL; o Diabetes mellitus tipo 2 (DM2) ya diagnosticada

Esta última definición es la más usada para describir esta patología, aunque sólo se aplica en caso de adultos.

2.1.1. EL SÍNDROME METABÓLICO EN EL EMBARAZO

En el caso de embarazadas, el propio embarazo fisiológicamente crea un entorno similar al SM para asegurar una nutrición adecuada al feto, pero no idéntico al de esta patología, que incluye el desarrollo en algunas mujeres de RI, hiperglucemia, hipertrigliceridemia e hipertensión. En embarazadas con SM por tanto, pueden aparecer daños tanto en la madre como en el feto, ya que al sumarse los síntomas del SM a los fisiológicos propios del embarazo, se exacerban los valores de hiperglucemia, dislipemia e hipertensión.

Está demostrado que las embarazadas con SM tienen mayor probabilidad de sufrir preeclampsia y partos prematuros, debido a la hipertensión, y a la hipercolesterolemia generada. Además la alteración de la nutrición del feto a través de la placenta, debido a los desórdenes en la glucemia, insulinemia y lípidos maternos, puede favorecer en la descendencia alteraciones metabólicas y cardiovasculares junto con un bajo peso al nacer (Malek, 2014).

En concreto, Zou y cols. (2012), demostraron en un estudio comparativo de ratas hembras no gestantes y gestantes, que la inducción del SM mediante dietas ricas en fructosa y en grasa, alteraban especialmente el metabolismo de las gestantes, que rápidamente generaban hiperglucemia y RI, en definitiva diabetes gestacional unida a esteatosis hepática. Estos autores demostraron las peculiaridades del SM durante la gestación, que genera un entorno fetal que puede alterar la programación metabólica de la descendencia.

Así, la iniciación del SM en la descendencia podría ser inducida a partir de la interacción entre la genética y el medio ambiente perinatal. Durante el embarazo, el desarrollo del feto es altamente susceptible a los cambios en el medio ambiente intrauterino, hasta el punto de ser capaz de modificar la expresión del genoma por los cambios epigenéticos para adaptarse a las condiciones intrauterinas. En consecuencia, el feto expuesto es muy propenso al desarrollo de trastornos metabólicos durante la vida postnatal. Por tanto, se podría decir que hay una herencia del SM en la primera generación de descendientes de las mujeres que lo padecen (González-Bulnes y cols., 2014) y que estos efectos no se limitan a la primera generación de descendientes, sino que pueden afectar a generaciones posteriores, dado que hembras descendientes de las mujeres con SM durante el embarazo son propensas a desarrollar SM en la edad adulta y también durante sus embarazos, lo que haría perdurar el trastorno generación tras generación (Dabelea y Crume, 2011).

2.1.2. EL SÍNDROME METABÓLICO DURANTE LA LACTANCIA

La lactancia provoca en la mujer modificaciones fisiológicas en el metabolismo, altera la homeostasis energética, aumenta los niveles de colesterol HDL, disminuye los triglicéridos y mejora la sensibilidad a la insulina en el posparto. Como consecuencia también debería mejorar el SM (Kalra y cols., 2015). Sin embargo, se ha demostrado que el rendimiento de la lactancia materna se ve mermado si la madre sufre SM (Stuebe, 2015).

Según Zou y cols. (2012), en un estudio comparativo de ratas hembras no gestantes y lactantes, la inducción del SM mediante dietas ricas en fructosa y en grasa, alteran especialmente el metabolismo de las madres lactantes, incluso más aún que en las gestantes, que generan hiperglucemia y RI, pero especialmente esteatosis hepática, con unas alteraciones muy importantes en este órgano. Además las crías de estas madres al final de la lactancia presentaron un menor peso e IMC que son síntomas claros de la mala adaptación metabólica de la descendencia.

2.1.3. EL SÍNDROME METABÓLICO EN PEDIATRÍA

En pacientes pediátricos no hay un consenso reconocido internacionalmente para definir el SM debido a los cambios en las características fisiológicas, metabólicas y clínicas asociadas a la pubertad y adolescencia, que impiden llegar a un acuerdo sobre los criterios para definir esta patología en niños (Goodman y cols., 2007; Morrison y Cols., 2008).

Zimmet y cols. (2007) establecieron una definición de SM pediátrico según grupos de edad, basada en la propuesta del IDF, que implica la medición de los siguientes parámetros: para los niños entre 6 y 10 años, tan sólo se mediría la obesidad central con un diámetro de cintura superior al percentil 90. Sin embargo, entre los 10 y 16 años se incluyen valores parecidos a los indicados en adultos:

- Obesidad central: diámetro de cintura mayor que el percentil 90
- Dislipidemia: TG 155 mg/dL, HDL-C 40 mg/dL
- Hipertensión: presión arterial 130/85 mmHg
- Glucemia 100 mg/dL o sufrir DM2

Todos los estudios propuestos en pediatría, incluyen mediciones para niños mayores de 6 años, dado que parece que no se puede diagnosticar SM antes de los 6 años (Bel y Murillo, 2011).

Sin embargo no se ha llegado aún a un consenso para definir el SM pediátrico, ya que midiendo los valores mostrados anteriormente propuestos por Zimmet (2007), dejaban fuera de diagnóstico a adolescentes con antecedentes familiares de SM (Brambilla y Pietrobelli, 2009), y por tanto, altas probabilidades de padecerlo.

Estudios de Magnussen y cols. (2010) sobre la detección del SM pediátrico centran la importancia del IMC para medir la adiposidad, dado que tras medir todos los demás parámetros propuestos por Zimmet (2007) descubrieron que tomando como referencia tan sólo un alto valor del IMC (superior al percentil 95 de la edad y sexo del niño) se podía diagnosticar el SM

de manera más eficaz, pues la medición de este parámetro es más sencilla y más precisa que las mediciones del resto de valores anteriormente propuestas para diagnosticar SM en niños, e incluiría a todos los casos diagnosticados mediante el estudio del resto de criterios.

2.2. SÍNDROME METABÓLICO Y ESTRÉS OXIDATIVO

2.2.1. ESTRÉS OXIDATIVO

En los organismos vivos existe un nivel basal estacionario de moléculas prooxidantes que bajo determinadas circunstancias, pueden aumentar desencadenando estrés oxidativo. Así pues, el estrés oxidativo (EO) es una situación de desequilibrio donde las sustancias prooxidantes sobrepasan la capacidad antioxidante celular, lo que llega a producir, potencialmente, daño en algunos componentes celulares como el ADN, las proteínas o los lípidos (Yan, 2014; Lushchak, 2014). Son varias las razones que producen este desequilibrio; así podemos destacar el incremento de los radicales libres y las especies reactivas del oxígeno (ROS), la disminución de las reservas de los antioxidantes en el organismo y la depleción o inactivación de determinadas enzimas antioxidantes.

El EO está involucrado en la patogénesis de muchas enfermedades como hipertensión, diabetes, Alzheimer, Parkinson, incluso ha sido identificado en las primeras etapas de estas enfermedades (Czerska y cols., 2015), siendo la presencia de los radicales libres una de las causas de su aparición. Sin embargo, recientemente se ha encontrado que existe un EO positivo (Yan, 2014) necesario en determinadas respuestas celulares, que puede proteger a la célula de cambios muy severos que de otro modo producirían daño oxidativo y apoptosis (Bouazid y cols., 2015).

2.2.2. ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO

Las ROS son compuestos químicamente más reactivos que el oxígeno (O_2), del cual derivan, que se generan por una amplia variedad de enzimas y

rutas metabólicas, entre las que encontramos la cadena de transporte de electrones mitocondrial (produce el 90 % de las ROS), el citocromo P450, la xantina oxidasa o la NADPH oxidasa.

Es muy frecuente nombrar a las ROS como radical libre, sin embargo, no siempre es correcto, ya que un radical libre es un átomo o molécula que contiene uno o más electrones no apareados, lo que lo hace muy inestable y reactivo (Valko y cols., 2004). Así, dentro de las ROS encontramos algunos radicales como el anión superóxido (O_2^-), el cual es el primero que se forma por la reducción secuencial del O_2 , y el radical hidroxilo (OH^\bullet), una de las especies más reactivas en el organismo. Por otra parte, entre los compuestos no radicales se encuentran el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), formado por la dismutación del anión O_2^- mediante la enzima superóxido dismutasa (SOD) (Battin y Brumaghim, 2009).

Las ROS tienen un papel dual en el organismo ya que, por un lado, pueden funcionar como especies beneficiosas, actuando como segundos mensajeros dentro de las cascadas de señalización intracelular o regulando la expresión de los genes y la función de algunas enzimas. Sin embargo, otras veces, estas especies reactivas pueden tener un papel deletéreo y producir daño oxidativo en las macromoléculas (ADN, lípidos y proteínas) así como apoptosis en las células sobre las que actúan, sobre todo si existe sobreproducción (Bouzid y cols., 2015).

2.2.3. SISTEMAS DE DEFENSA ANTIOXIDANTES

Para proteger al organismo de los efectos adversos que producen las ROS existen diversos sistemas de defensa antioxidante, tanto endógenos como exógenos. Estos antioxidantes, aun estando en muy baja concentración, pueden eliminar las ROS o minimizar los efectos negativos que producen.

Los antioxidantes exógenos como las vitaminas C (ácido ascórbico) y D (tocoferol), los carotenoides y polifenoles, y minerales como el selenio y el zinc son añadidos al organismo a través de la dieta (Lushchak, 2015).

Por otro lado, los sistemas de defensa antioxidantes endógenos más importantes del organismos son el glutatión (GSH) así como el sistema enzimático formado por las cuatro enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR) (Peng y cols., 2005) (Figura 2.2.3).

El GSH es un antioxidante muy importante que se sintetiza en la mayoría de los organismos vivos. Este antioxidante puede interaccionar directamente con las ROS y las elimina o bien sirve como cofactor de determinadas enzimas antioxidantes, con propiedades detoxificantes, entre las cuales destaca la GPx (Lushchak, 2015).

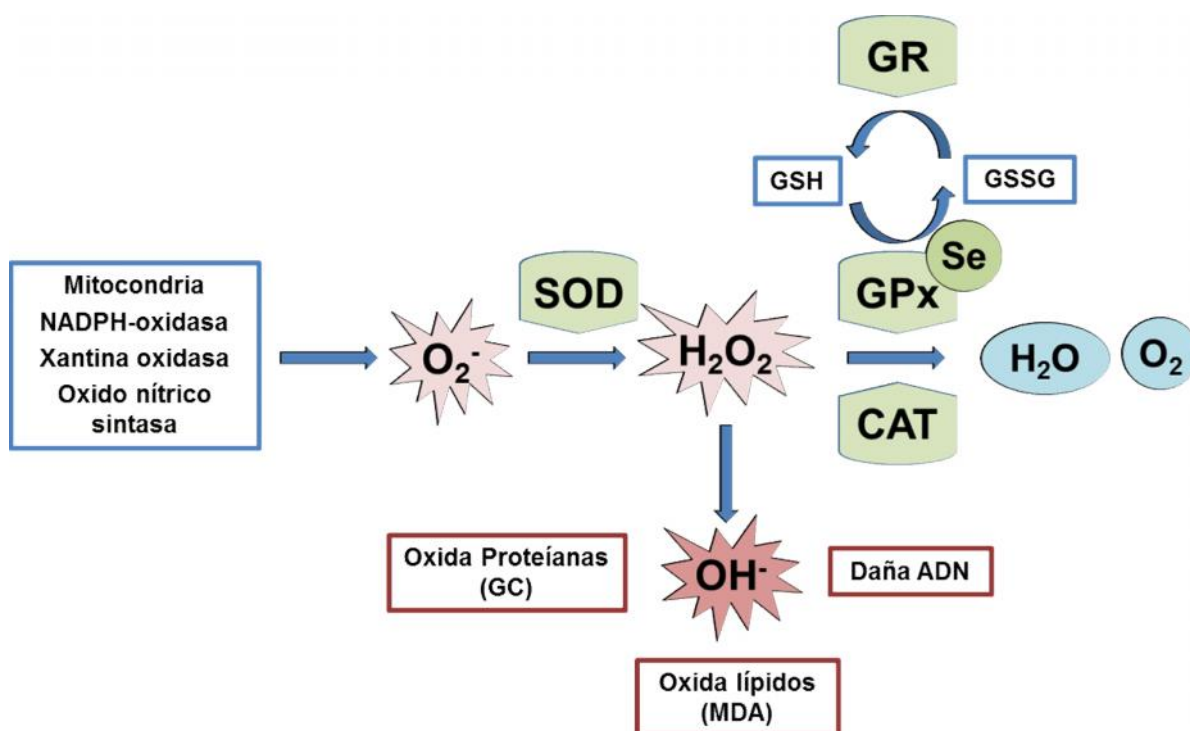


Figura 2.2.3. Actuación de las enzimas del sistema de defensa antioxidante más importante del organismo. GC: grupos carbonilos; MDA: malonildialdehído.

La enzima SOD es la primera enzima que participa en la eliminación de las ROS y cataliza la dismutación del anión $O_2^{\cdot -}$ generando como subproductos H_2O_2 y O_2 . Esta enzima está distribuida por todo el organismo y presenta 3 isoformas: La Cu/Zn SOD que se encuentra en el citosol de las células, la Mn-

SOD localizada en la mitocondria, y finalmente, hay un tercer tipo de SOD que está presente en el medio extracelular (EC-SOD) (Valko y cols., 2006).

La CAT es una enzima presente en los peroxisomas y a nivel tisular se encuentra, principalmente, en la sangre, la medula ósea, los riñones y el hígado. Esta enzima actúa, junto con la GPx, detoxificando el H_2O_2 hasta H_2O y O_2 , sin embargo, la CAT es más eficiente frente a bajas concentraciones del H_2O_2 (Valko y cols., 2006; Bouzid y cols., 2015).

La familia de las GPxs son de las primeras proteínas humanas conocidas que incorporaron selenio en forma de selenocisteína dentro de su núcleo catalítico, por ello forman parte del grupo de las selenoproteínas. Estas enzimas catalizan la reducción de H_2O_2 y los peróxidos orgánicos a H_2O y O_2 , protegiendo, de esta manera, a las células del daño oxidativo (Papp y cols., 2007; Negro, 2008; Bouzid y cols., 2015). Al contrario que la CAT, las isoformas de la GPx actúan preferentemente frente a altas concentraciones de H_2O_2 y utilizan como cofactores el GSH reducido y el NADPH. Los niveles de GSH reducido se mantienen constante por la reducción del glutatión oxidado (GSSG o glutatión disulfido) que cataliza la enzima GR.

La GR es una flavoproteína dependiente del NADPH que actúa de manera coordinada con la GPx. Su función principal es la de mantener el GSH y controlar el estado redox del NADP en tejidos donde el GSSG está disponible, teniendo como objetivo contribuir a la regulación del ciclo metabólico de este antioxidante (Vasconcelos y cols., 2007).

2.2.4. RELACIÓN ENTRE ESTRÉS OXIDATIVO Y SÍNDROME METABÓLICO

El EO juega un papel clave en la patogénesis del SM y en la aparición de las alteraciones relacionadas como la intolerancia a la glucosa, la RI, así como la diabetes y la enfermedad cardiovascular (Ceriello and Motz, 2004; Camargo et al., 2014), ya que desencadena o exacerba muchos de los procesos bioquímicos que acompañan a las alteraciones vasculares (Storcker y

Keaney, 2004) y es un importante mecanismo en la patogenia de la obesidad y la diabetes (Furukawa y cols., 2004) (Figura 2.2.4).

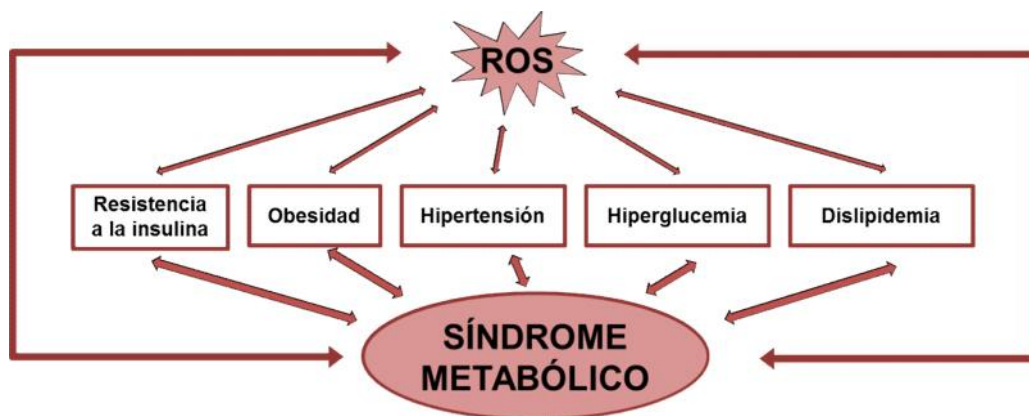


Figura 2.2.4. Relación entre las ROS y los factores implicados en el SM.

2.2.4.1. Estrés oxidativo y resistencia a la insulina

Determinados estudios han establecido que el EO y los niveles elevados de ROS están relacionados con el comienzo, la progresión y el desarrollo de diabetes y de RI (Zhai y cols., 2011) ya que activan las cascadas de señalización en respuesta al estrés como es el caso de la cascada de las MAP Kinasas (Al-Lahham y cols., 2015). Mediante esta vía se induce la fosforilación de los residuos de serina (Ser)/treonina (Thr) de IRS-1, lo que promueve la liberación de esta molécula del lado citoplasmático de la membrana y su posterior degradación y disminución. En definitiva, como consecuencia del EO los niveles funcionales de IRS-1 disminuyen y la insulina no puede ejercer su acción en las células, lo que desencadena la resistencia a esta hormona.

También se ha estudiado que la exposición prolongada a las ROS afecta a la transcripción de los transportadores de glucosa, de manera que aumentan los niveles de GLUT1 y se reduce la formación de GLUT4, alterando la correcta absorción de glucosa por parte de las células (Bloch-Damti y Bashan, 2005; Kamigaki y cols., 2006).

2.2.4.2. Estrés oxidativo y obesidad

La obesidad está estrechamente relacionada con el EO, así se han observado altos niveles de marcadores de EO en individuos obesos o que han incrementado su peso (Lugogo y cols., 2011; Keaney y cols., 2003). La mayoría de las ROS presentes en las personas obesas son consecuencia del estilo de vida que llevan, más sedentario y sin practicar deportes, o bien, de las comorbilidades asociadas a la obesidad. La hipertensión, la RI, la DM2 y/o la hiperlipidemia son comorbilidades que aparecen en estos individuos y fomentan el EO. La mayoría de las veces, además, aparecen de forma simultánea, como sucede en el SM, de manera que los pacientes obesos y con SM tienen mayor EO que los individuos obesos sin este síndrome (Bonomini y cols., 2015).

También se ha observado que los individuos obesos presentan mayor cantidad de leptina y resistina (dos hormonas proinflamatorias) mientras que tienen disminuidos los niveles de adiponectina, hormona con un potente efecto antiinflamatorio y antioxidante, capaz de sensibilizar frente a la insulina y que previene y trata el SM y las enfermedades asociadas (Esfahani y cols., 2015). La adiponectina se correlaciona inversamente con la grasa abdominal y con los factores de riesgo cardiovascular y es directamente modificada por las ROS (Bonomini y cols., 2015). De acuerdo con esto, determinados estudios han encontrado niveles reducidos de adiponectina tras la exposición al H_2O_2 , incluso tras una exposición breve (Kamigaki y cols., 2006). Este hecho desencadena la aparición de una serie de cambios vasculares y desórdenes metabólicos que conllevan al SM.

2.2.4.3. Estrés oxidativo e hipertensión

El EO es uno de los mecanismos fundamentales en el desarrollo de la hipertensión. Las ROS desempeñan un papel fundamental en la homeostasis de la pared vascular, ya que, entre otras cosas, neutralizan el óxido nítrico (NO) y alteran la vasodilatación del endotelio, desencadenando la aparición de hipertensión (Lassègue y Griendling, 2004). El anión O_2^- formado por la

NADPH oxidasa, la mitocondria, la xantina oxidasa o la óxido nítrico sintasa (NOX) del endotelio vascular, inactiva el NO para formar peroxinitrito. Esta inactivación del NO altera la vasodilatación dependiente del endotelio y desacopla a la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) que produce más anión O_2^- adicional, aumentando así la oxidación y por tanto, desencadenando más hipertensión (Gonzalez y cols., 2014).

Se ha observado que los pacientes con hipertensión tienen EO en el plasma y un sistema de defensa antioxidante alterado, pero además tienen niveles reducidos de vitamina C y un incremento de 8-isoprostano en el plasma, lo cual se correlaciona con la presión sanguínea sistólica y diastólica (Bonomini y cols., 2015).

2.2.4.4. Estrés oxidativo y dislipidemia

La dislipidemia, caracterizada por un aumento de las LDL y los triglicéridos y por una disminución de las HDL, es un componente frecuente del SM que se correlaciona también con el EO. Así, se ha establecido en animales, una correlación positiva entre los niveles elevados de LDL y triglicéridos y el EO y negativa en el caso de la HDL (de Oliveira y cols., 2011). Estas observaciones también son extrapolables a humanos, de manera que se han observado marcadores del estrés oxidativo, triglicéridos elevados y una baja concentración de HDL en pacientes con SM y enfermedad renal (Marques de Mattos y cols., 2012).

2.2.4.5. Estrés oxidativo e hiperglucemia

En el SM, la hiperglucemia (en ayunas o postpandrial) y la DM2 están relacionadas con el EO. Giacco y Brownlee (2010) establecieron que el EO juega un papel muy importante en el desarrollo de las complicaciones en la DM2, tanto a nivel microvascular como cardiovascular. Estos autores sugieren que los desórdenes glucémicos observados en pacientes diabéticos o con hiperglucemia resultan de una activación del EO que conlleva a la

sobreproducción de anión O_2^- en la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Este incremento en la formación del anión O_2^- causa la activación de 5 vías principales implicadas en la aparición de las complicaciones propias de la diabetes, como son:

- 1) Aumento del flujo de glucosa y otros azúcares al interior celular a través de la vía poliol (vía no dependiente de insulina);
- 2) Incremento en la formación de productos finales de la glicosilación (AGE);
- 3) Activación de la proteína C kinasa;
- 4) Activación del factor nuclear κB (NF κ B);
- 5) Incremento del flujo de glucosa hacia la vía de las hexosaminas (Bonomini y cols., 2015).

Son numerosos los estudios que analizan en plasma y en orina los marcadores del EO y del estado antioxidante en los pacientes con DM2 (Morrow y cols., 1991; Roberts y Morrow, 2000). Además, puesto que en todos los casos, la producción de radicales libres estaba aumentada, se ha sugerido que la hiperglucemia es un factor que contribuye directamente en la generación de EO (Davi y cols., 2005). También se ha encontrado que existe una correlación entre los niveles de 8-isoprostano en orina y la glucosa en sangre, lo que sugiere que la activación del EO puede estar, al menos en parte, relacionada con la diabetes (Monnier y cols., 2006; Bonomini y cols., 2015).

2.3. SÍNDROME METABÓLICO Y RESISTENCIA A LA INSULINA

La relación patogénica entre el SM, la DM2 y las complicaciones cardiovasculares es la existencia de RI (Muntoni, 2011).

La insulina juega un papel fundamental en la homeostasis de la glucosa, mediante la regulación del balance entre la producción de glucosa por el hígado y el consumo por el músculo y tejido adiposo (Kim y Feldman, 2015).

Otras funciones de esta hormona son controlar la producción de glucosa por medio de la inhibición de la gluconeogénesis y glucogenólisis en el hígado. También influye en la síntesis de proteínas, almacenamiento de grasa, crecimiento de las células y proliferación y diferenciación celular, aumenta la replicación del ADN y disminuye la proteólisis (Meshkani y Adeli, 2009) (Figura 2.3).

La RI se caracteriza por una disminución en la capacidad de la insulina para llevar a cabo sus funciones fisiológicas normales en los adipocitos, músculo e hígado, provocando un aumento de la insulinemia basal para mantener la glucemia en un rango normal (Petersen y Shulman, 2006; Meshkani y Adeli, 2009). Esta patología suele preceder a situaciones patológicas como la DM2 o el SM y se asocia al sobrepeso y obesidad. La RI toma importancia durante el envejecimiento, la gestación y en el síndrome de ovario poliquístico (Serrano-Ríos y Cascales, 2015). Además, se ha demostrado que es un factor de riesgo cardiovascular y que los sujetos con mayor RI tienen más riesgo de desarrollar complicaciones vasculares (Sanhueza y cols, 2014; Kilpatrick y cols, 2007).

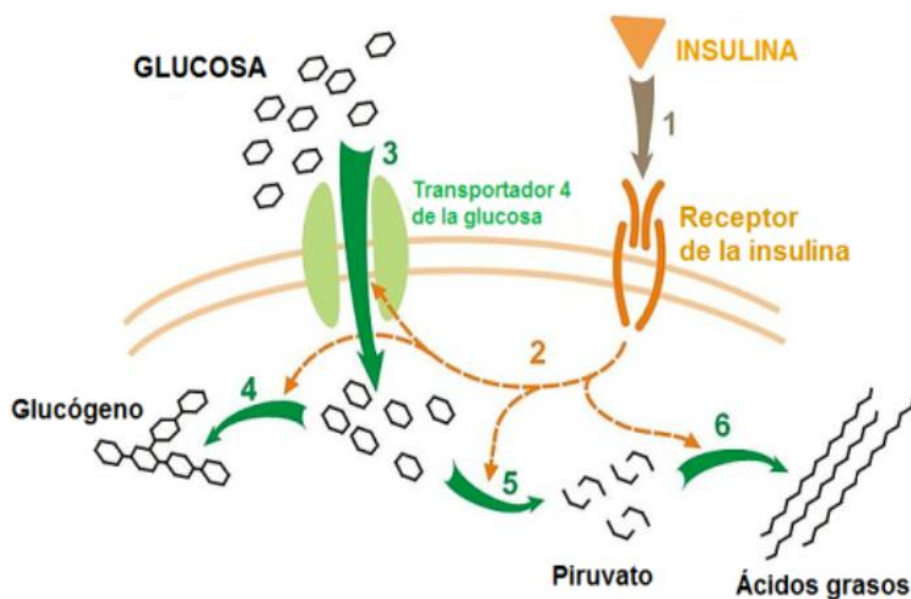


Figura 2.3. Múltiples funciones de la insulina. (1) La insulina se une a su receptor. (2) Activación del transportador de la glucosa (GLUT4). (3) Entrada de glucosa en la célula. (4) Síntesis de glucógeno. (5) Conversión de glucosa en piruvato. (6) lipogénesis de novo. Tomada de Benito de las Heras (2014).

La RI se asocia con la mayoría de los casos de DM2 y de SM, y puede desencadenarse por diferentes causas, pero la principal es la hiperlipidemia, los estados proinflamatorios y el EO asociados a la obesidad, que favorecen la inhibición de la cascada de señalización de la insulina (Johnson y cols., 2009; Serrano-Ríos y Cascales, 2015).

En el comienzo de la RI, el cuerpo genera mecanismos compensatorios que durante un tiempo mantiene la glucemia bajo control a costa de la hipersecreción de insulina. Sin embargo, esta situación desemboca en un fracaso pancreático, donde las células no son capaces de mantener la hipersecreción de insulina, empiezan a deteriorarse y ese deterioro trae consigo la menor secreción de insulina. Así, la hiperinsulinemia crónica contribuye directamente al fracaso de la célula pancreática y desencadena una diabetes (Serrano-Ríos y Cascales, 2015).

2.3.1. CUANTIFICACIÓN DE LA RESISTENCIA A LA INSULINA

Para medir la RI uno de los métodos más usados es el cálculo del índice HOMA-IR (Homeostatic Model Assessment Insulin Resistance) que se establece a partir de la relación entre la glucemia basal y los niveles de insulina sérica, evaluando el balance entre la producción hepática de glucosa y la secreción de insulina por el páncreas. Los valores se obtienen utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{Insulina (mUI/L)} \times \text{glucosa (mg/dL)}}{405}$$

Además, podemos calcular el funcionamiento de las células que valora el balance entre la producción hepática de glucosa y la capacidad del páncreas para segregar insulina. Los valores se obtienen utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Células } \beta \text{ funcionales} = \frac{\text{Insulina (mUI/L)} \times 360}{\text{Glucosa (mg/dL)} - 63}$$

Se considera que en individuos sanos, con un índice de masa corporal normal y sin antecedentes familiares de diabetes, el valor del HOMA-IR estaría muy cercano a 1, y el funcionamiento de las células β , cercano al 100%. Valores de HOMA-IR por encima de 1 representarán un nivel creciente de RI. Ambos índices deben utilizarse conjuntamente para evitar interpretaciones erróneas (García- Fuentes y cols., 2008).

2.3.2. CONSECUENCIAS DE LA RESISTENCIA A LA INSULINA EN LOS TEJIDOS:

Según los estudios de Meshkani y Adeli (2009), la RI afecta de diferente forma a los distintos tejidos diana de la insulina.

En el tejido adiposo, además de disminuir la entrada de glucosa en este tejido, aumenta la hidrólisis de triglicéridos desde los adipocitos, lo que provoca un aumento de ácidos grasos libres (AGL) en el plasma.

En el músculo esquelético, la RI dificulta la entrada de glucosa en este tejido, pero además, el incremento de AGL generado en plasma es utilizado por los músculos para obtener energía, disminuyendo aún más el ingreso de glucosa en el músculo.

En el hígado se produce una disminución en la síntesis de glucógeno, y fallos en la inhibición de producción de glucosa, aumenta la lipogénesis y la síntesis de proteínas.

Por último, la no entrada de glucosa en sus tejidos dianas provoca una hiperglucemia elevada y descontrolada, que produce una hiperestimulación de las células del páncreas, que liberan más insulina para metabolizar esa glucosa. Sin embargo al existir resistencia a la actividad de dicha hormona, esta estrategia no es eficaz, y termina provocando incompetencia de las células, exacerbando esta patología.

Por todo ello la RI provoca hiperglucemia, hipertrigliceridemia, e hiperinsulinemia que provocan un aumento de la glucosuria, de la osmolaridad de la orina y de la reabsorción renal de Na^+ . El aumento del sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona también genera vasoconstricción, por todo ello se favorece la aparición de hipertensión arterial (HTA). Además como se comentó anteriormente, la RI está relacionada con un incremento del EO, de aumento de factores proinflamatorios: PCR, IL-6, TNF- ..., y protrombogénicos: fibrinógeno, PAI-1... Todo esto concurre en un aumento del riesgo cardiovascular.

2.3.3. SUSTRATO DEL RECEPTOR DE INSULINA (IRS):

El receptor de insulina (IR) pertenece a la familia de receptores de superficie celular con actividad intrínseca tirosina quinasa que, al ser estimulados por la insulina, se autofosforilan en los residuos de tirosina (Tyr).

Como se muestra en la Figura 2.3.3, el IR está formado por dos subunidades α extracelulares, con sitios de unión para la insulina, y dos subunidades transmembrana β , unidas entre sí por puentes disulfuro y con dominios tirosina quinasa en el lado intracelular (Gual y cols., 2005).

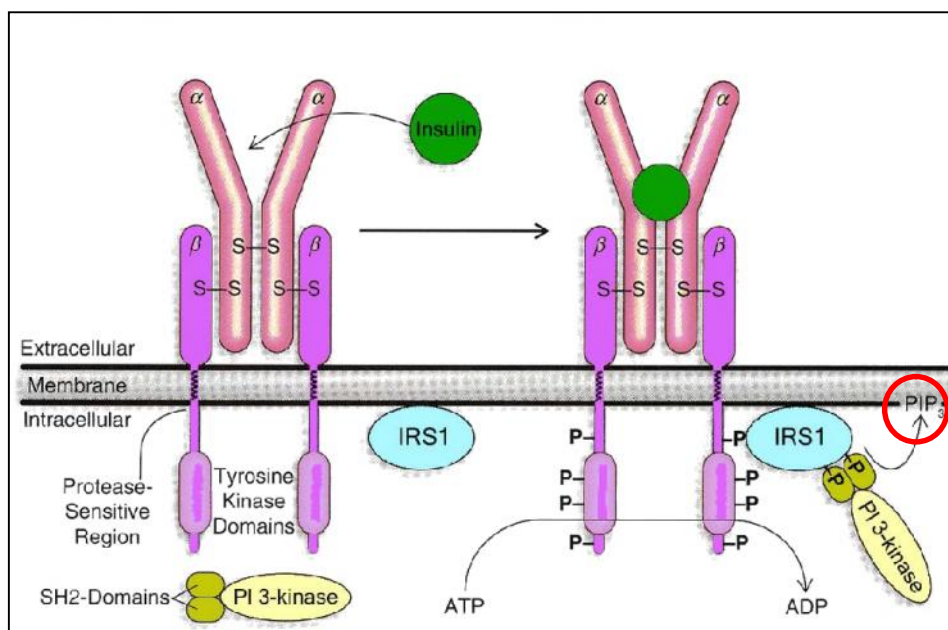


Figura 2.3.3. Receptor de insulina. Tomado de www.trinity.edu

Cuando la insulina se une a la subunidad del IR se produce la autofosforilación de los residuos de tirosina de la subunidad, lo que permite que se unan las proteínas sustrato del receptor de insulina (IRS), de las que se conocen hasta 4 isoformas (Boura-Halfon y Zick, 2009).

En la familia IRS, IRS-1 es el principal mediador de insulina en músculo, tejido adiposo y células pancreáticas; también está presente en el hígado y fue el primero en ser identificado. IRS-1 no muestra actividad enzimática intrínseca pero presenta dominios Tyr que se fosforilan, y activan a su vez, a otras proteínas de la vía de señalización de la insulina (Boura-Halfon y Zick, 2009). IRS-2 tiene una gran importancia en la respuesta periférica a la insulina y el crecimiento y funcionamiento de las células pancreáticas. IRS-3 está situado principalmente en la membrana plasmática y parece ser capaz de mediar señales mitogénicas, mientras que IRS-4 se expresa en diversos tejidos humanos y líneas celulares aunque no es muy abundante.

2.3.4. CASCADA DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA:

Cuando la insulina llega a su tejido diana se une el IRS al IR, y se activan dos vías de señalización: la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y el factor de crecimiento proteína de unión al receptor 2 (GRB2).

Tras activarse, la PI3K fosforila al fosfatidilinositol-3,4-difosfato (PIP₂) hasta fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃), que se encuentra en la membrana. El PIP₃ activa a la quinasa dependiente de PIP₃ (PDK1), que activará a la proteína quinasa B (PKB), también conocida como Akt. Ésta actúa sobre diversas vías que regulan la homeostasis de lípidos, carbohidratos y proteínas (Figura 2.3.4.1).

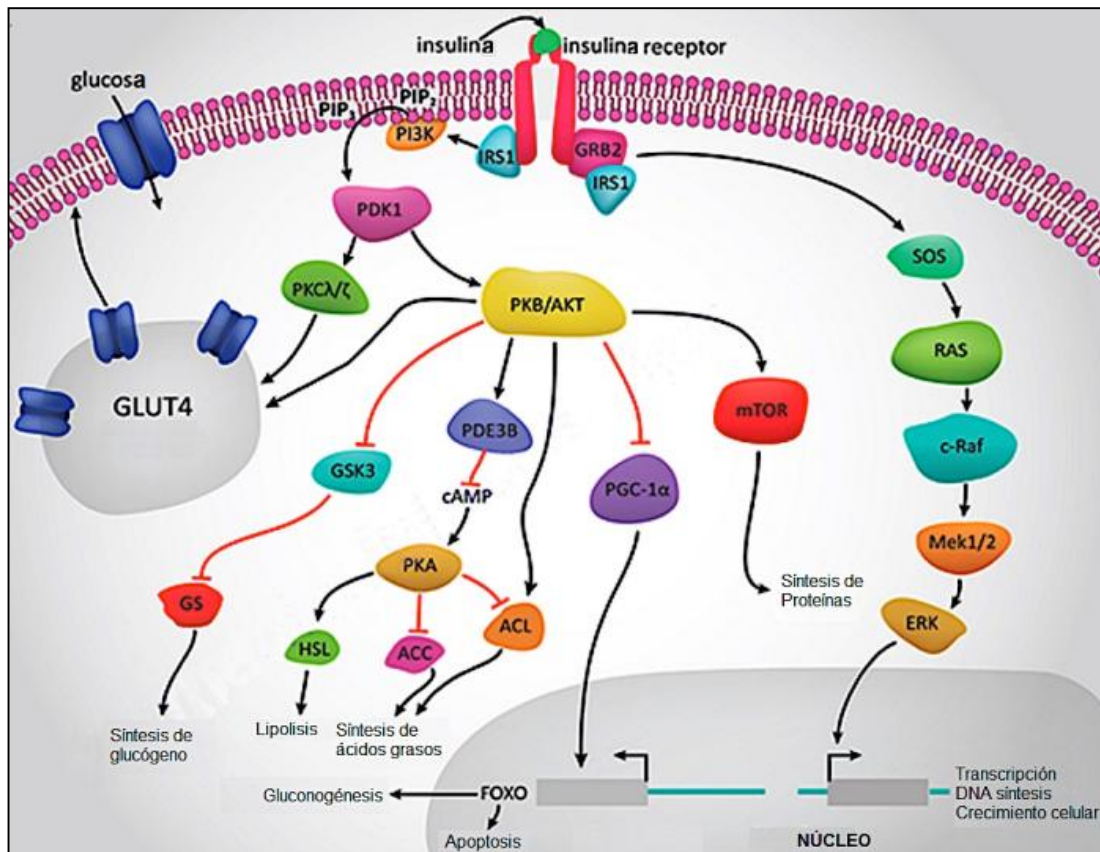


Figura 2.3.4.1. Vía de señalización de la insulina. PDE: fosfodiesterasa; GS: glucógeno sintasa; HSL: lipasa sensible a hormonas; ACC: acetil-CoA carboxilasa; ACL: ATP-citrato liasa. Tomado de Serrano y Cascales, 2015.

Además, cuando se activa PDK1, también fosforila a la proteína quinasa C (PKC), que fosforila las vesículas intracelulares que contiene la proteína transportadora GLUT4, haciendo que migre a la membrana, desencadenando la entrada de glucosa en la célula por transporte facilitado (Figura 2.3.4.1).

Por otro lado, como se muestra en la Figura 2.3.4.1, la activación de GRB2 por IRS-1 provoca la transducción de señales por medio de la proteína G monomérica (RAS), que al activarse provoca cambios en la expresión de genes por la activación de quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK). Los cambios transcripcionales en la síntesis de ADN ocurridos favorecen la síntesis de proteínas y ácidos grasos, en definitiva el crecimiento celular.

El transporte de glucosa también está regulado por las proteínas tirosina fosfatasa: fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN) y proteína tirosina fosfatasa 1 B (PTP1B). Así, como muestra la Figura 2.3.4.2, la proteína PTEN desfosforila el PIP3 necesario para la activación de la PI3K, hasta

fosfatidilinositolbifosfato (PIP2), mientras que la proteína PTP1B desfosforila los residuos Tyr de IRS-1, de manera que ambas proteínas actúan inhibiendo la cascada de señalización y por tanto, suprimiendo la activación de Akt (Mobasher y cols, 2014).

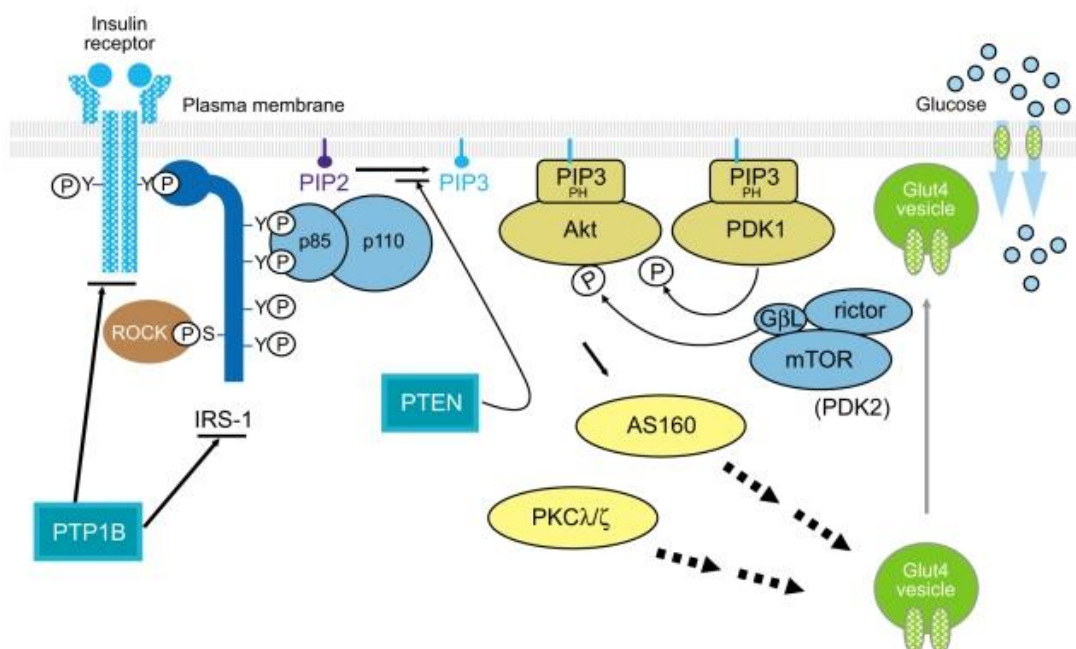


Figura 2.3.4.2. Inhibición de la vía de señalización de la insulina por PTEN y PTP1B.
 PTP1B: proteína tirosina fosfatasa 1B; IRS: sustrato del receptor de insulina; ROCK: Rho-quinasa; PIP: fosfatidilinositol fosfato; PTEN: fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa; dominio PH: dominio con homología a la Pleckstrina; PDK: proteína quinasa dependiente de fosfoinositida; GβL, subunidad como proteína-G beta; mTOR: diana de rapamicina en mamíferos; AS160: Sustrato AKT de 160 kDa; PKC / ζ, proteína quinasa C y ; Glut4: Transportador de glucosa 4. Tomado de Choi y Kim, 2010.

2.3.5. RELACIÓN DEL IRS CON LA RESISTENCIA A LA INSULINA:

A nivel molecular los mecanismos por lo que se produce RI aún no están bien definidos. Algunos mecanismos propuestos son una producción anormal de insulina, mutaciones en el receptor de insulina y su sustrato, antagonistas de la insulina, pero sobre todo, parece deberse a un defecto en la cascada de señalización tras unirse a su receptor y activar su sustrato (Meskani y Adeli, 2009). Así, entre los principales mecanismos propuestos para la aparición de RI se encuentran:

1. Disminución de la expresión o aumento de la degradación de IRS. En ratones IRS-1 knockout, se descubrió que presentaban RI pero no sufrían

hiperglucemia; sin embargo, los ratones IRS-2 deficientes sufrían una gran hiperglucemia junto con RI en hígado y fallo en la secreción de las células β .

2. Modificaciones postranscripcionales de moléculas de señalización de la cascada de insulina (Figura 2.3.4.3) como:

- a. Alteración de quinasas tipo PKC que inhibe IRS-1 y por tanto de la cascada de insulina. Este aumento de PKC puede ser debido a un aumento de los niveles de ácidos grasos saturados como el palmitato en sangre.
- b. Inducción de factores inhibidores, como supresores de la señal de citokinas (SOCS). Normalmente sintetizados en respuesta a un aumento de citokinas (CK) y/o de ácidos grasos saturados que favorecen la síntesis de NF κ B, ambas situaciones están presentes en el SM. Los SOCS, finalmente bloquean la cascada de insulina compitiendo con IRS-1 por la unión con el IR, y aumentan la degradación de IRS-1.
- c. Aumento de la actividad de fosfatasa que desfosforilan moléculas intermediarias que inhiben la cascada de insulina, como PTEN y PTP1B. El incremento de PTP1B puede deberse al aumento de la expresión del NF κ B provocada por el SM. Por otro lado, se ha encontrado que ratones con deficiencia de PTP1B no aumentaban de peso y tenían mayor sensibilidad a la insulina aunque su dieta fuera elevada en grasas. Por el contrario, pacientes con RI y obesidad, mostraron una alta expresión de PTP1B en sus tejidos. Recientemente también es relevante el trabajo de Mobasher y cols., (2014) que ha demostrado los efectos beneficiosos de la inhibición de PTP1B, que actúa inhibiendo la vía de señalización de la insulina en los primeros pasos, como un mecanismo para superar la resistencia a la insulina hepática causada por la deficiencia IRS en ratones. La otra proteína fosfatasa PTEN también inactiva PI3K, inhibiendo la señal de insulina (Figura 2.3.4.2), por tanto su sobreexpresión favorece la RI.
- d. Inducción de la quinasa c-jun N terminal (JNK) que inhibe la fosforilación de IRS. Este aumento puede deberse al aumento de ácidos grasos saturados en sangre que generan estrés en el retículo endoplasmático (RE) de la célula, o al aumento de CK en sangre.

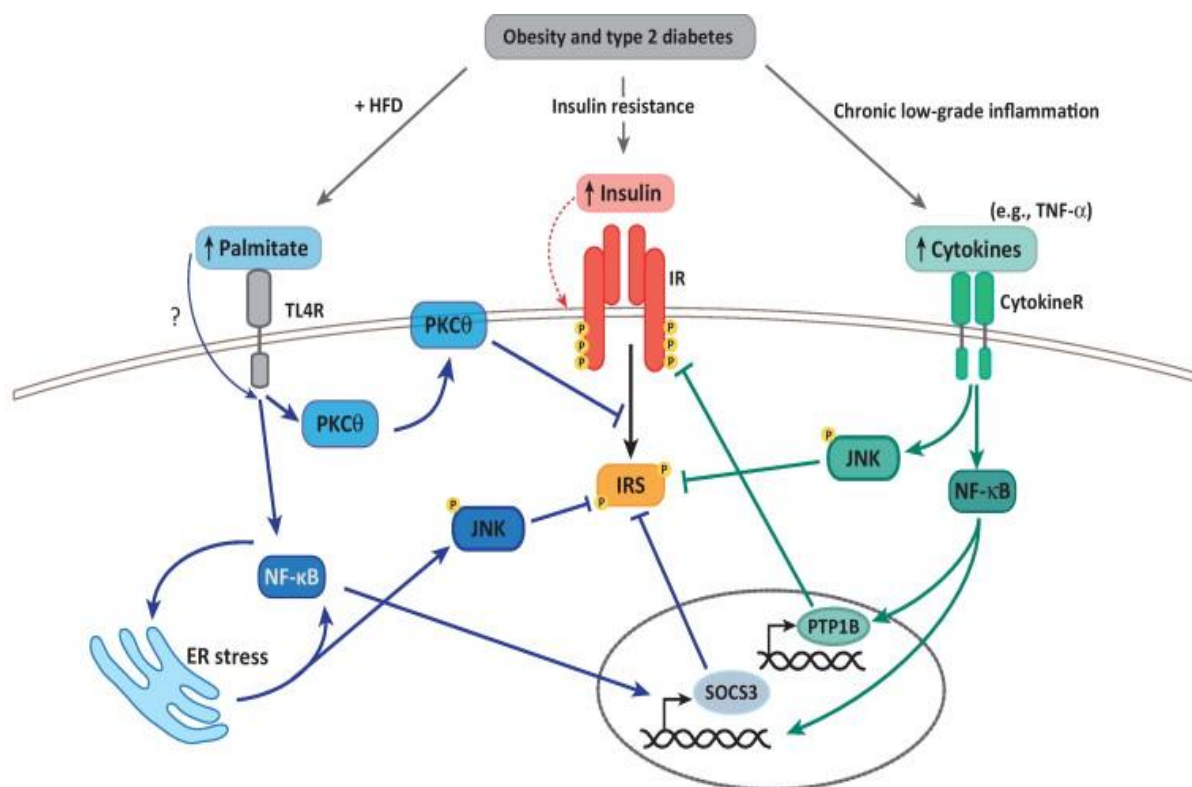


Figura 2.3.4.3. Mecanismos de inhibición de la cascada de insulina durante la obesidad y la diabetes tipo 2, debido principalmente a un aumento en sangre de los ácidos grasos saturados como el palmitato, un aumento de insulina y al aumento de citocinas circulantes debido a la inflamación crónica instaurada. Tomado de Vogt y Brüning, 2013

Por todo ello, Berends y cols., (2013) mostraron que IRS es un marcador de riesgo de diabetes, demostrando que la expresión de IRS-1 se encuentra disminuida en individuos predispuestos a la diabetes y en individuos con bajo peso al nacer.

En este contexto Gou (2014) defiende que la pérdida de expresión de IRS-1 e IRS-2 en el hígado y el cerebro da lugar a una hiperglucemia, mientras que la pérdida en otros tejidos, tales como el corazón y el páncreas, da lugar a insuficiencia funcional de dichos órganos, relacionándolo con el SM y sus complicaciones.

Así, la disminución de IRS-1 es actualmente un marcador utilizado para diagnosticar el riesgo de sufrir RI y DM2, ya que como demuestran Park y cols. (2015), la deficiencia de IRS-1 causa RI, porque además juega un papel muy importante en la secreción de insulina por las células del páncreas.

Más aún, Hu y cols. (2014) han demostrado, in vitro e in vivo, una mejora sustancial en la RI usando una mezcla de hierbas medicinales chinas que incrementan la síntesis de IRS-1 y de PI3K.

2.3.6 PROTEÍNA QUINASA ACTIVADA POR ADENOSIN MONOFOSFATO (AMPK) Y SU RELACIÓN CON LA RESISTENCIA A LA INSULINA Y EL SÍNDROME METABÓLICO

La AMPK es un complejo enzimático heterotrimérico con actividad quinasa de serina (Ser) y treonina (Thr), que regula la homeostasis energética del cuerpo. Comprende tres subunidades: una unidad catalítica, que presenta dos isoformas, α_1 y α_2 , y dos reguladoras: β con dos isoformas β_1 y β_2 , y γ que consta de tres isoformas γ_1 , γ_2 y γ_3 (Rajamohan y cols., 2015) (Figura 2.3.6.1). La activación de la AMPK depende fundamentalmente de la fosforilación en Thr172 en el dominio catalítico de la subunidad α mediante la quinasa LKB1 (Foretz y cols., 2006). Por otro lado, la proteína fosfato 1 (PP1) es la encargada de desfosforilar a la AMPK y volverla inactiva.

La isoforma α_1 se expresa ampliamente, aunque predomina en páncreas y tejido adiposo, mientras que la isoforma α_2 tiene sus más altos niveles de expresión en células pancreáticas, neuronas, corazón y el músculo esquelético. El hígado tiene 50% de cada isoforma AMPK (α_1 y α_2) (Hurtado y cols., 2013).

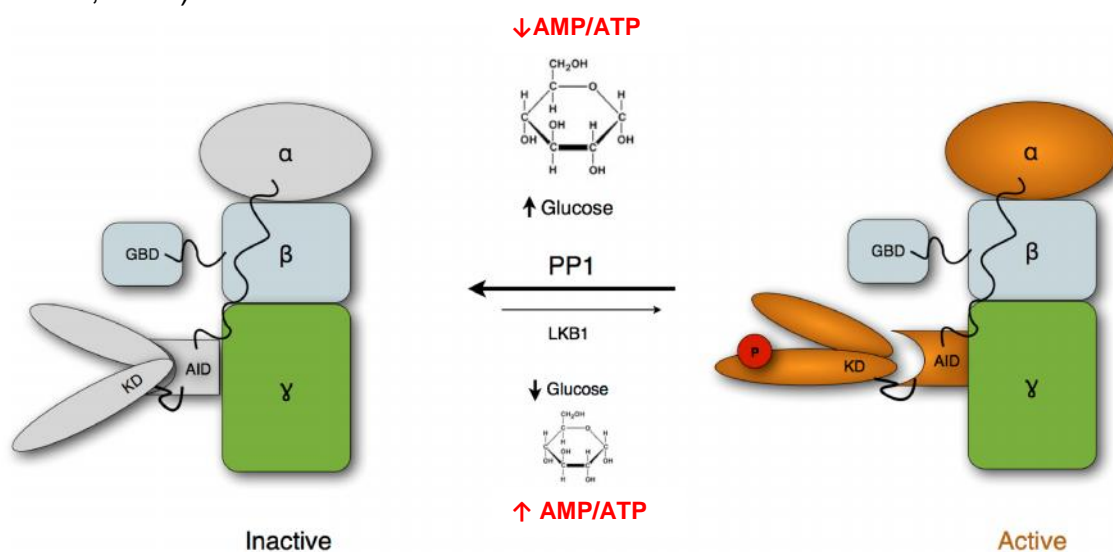


Figura 2.3.6.1. Representación de la estructura de las subunidades del AMPK y su fosforilación Tomado de: <http://www3.ibv.csic.es/>

El principal estímulo activador de la AMPK es la depleción energética manifestada por un aumento en la relación AMP/ATP, como muestra la Figura 2.3.6.1, aunque también puede ser activada por el estrés celular, la hipoglucemia, la hipoxia y el ejercicio (Ruderman y cols., 2013). Además, la AMPK puede ser activada alostéricamente en la subunidad α por AMP e inhibida por ATP. Así, AMPK puede detectar cambios en el estado de energía de las células producidos como respuesta a las variaciones de nutrientes. Cualquier circunstancia que reduzca la producción de ATP (por ejemplo: shock térmico, hipoxia, isquemia o la privación de glucosa) o acelere el consumo de ATP (por ejemplo, la contracción del músculo esquelético) aumentará la proporción ADP/ATP, que se amplifica por la acción de la enzima adenilato quinasa, resultando en un aumento de AMP/ATP con la consiguiente activación de AMPK.

Una vez activada, la AMPK primero afecta directamente a la actividad de las enzimas clave de los ácidos grasos y el metabolismo de la glucosa, y a largo plazo controla la transcripción de los principales elementos que intervienen en estas vías metabólicas. El resultado de la activación de AMPK es restaurar el balance de energía, inhibiendo las vías anabólicas responsables de la síntesis de proteínas y glucógeno, y también de ácidos grasos, triglicéridos y colesterol, y activando las vías catabólicas como la oxidación de ácidos grasos, la captación de glucosa y la glucólisis (Hurtado y cols., 2013).

La relación entre RI, SM y AMPK se basa en su influencia sobre el transporte de glucosa y la lipogénesis y la evidencia epidemiológica de que enfermedades asociadas con el SM son menos prevalentes en personas físicamente activas, junto con la demostración de que practicar ejercicio regularmente mejora la acción de la insulina en todo el cuerpo y disminuye la hiperinsulinemia, pues el ejercicio aumenta considerablemente la acción del AMPK. Ruderman y cols. (2013), demostraron que AMPK también regula el crecimiento y proliferación celular, la función mitocondrial y la biogénesis, y factores relacionados con RI como la inflamación, EO y la autofagia celular, y que la actividad de AMPK se encuentra disminuida en el tejido adiposo de personas muy obesas con RI, en los que está asociado con aumentos en el EO

y cambios en la expresión génica. Estos cambios también están asociados con alteraciones en la liberación de numerosos factores que podrían contribuir a RI y disfunción en otros tejidos que conducen a enfermedades asociadas al SM.

La activación de AMPK se asocia con una gran cantidad de efectos beneficiosos en patologías asociadas al SM. Sus posibles beneficios en las células del páncreas, el hígado y el músculo han sido demostrados en diferentes estudios (Viollet y Andreelli, 2011). Además, en la RI se produce una disminución en la actividad de AMPK, mientras que la activación de AMPK aumenta la sensibilidad a la insulina.

Finalmente, a nivel molecular, se ha demostrado recientemente que cuando se fosforila el IRS tras la llegada de insulina, este regula directa y positivamente al AMPK, relacionándose así directamente la insulina, el IRS y el AMPK (Sonntag y cols., 2012). Posteriormente en la cascada de señalización de la insulina, el AMPK actúa inhibiendo al mammalian Target of Rapamycin (mTOR) (Figura 2.3.6.2).

La mTOR es una quinasa de Ser/Thr que pertenece a la familia kinasa relacionada con la PI3K y que actúa como un importante controlador de la síntesis proteica y del crecimiento celular, que se activa en abundancia de nutrientes. Por ello cuando la insulina llega a su receptor termina estimulando al mTOR por la vía del Akt. Así el Akt, además de permitir la entrada de glucosa en la célula, fosforila el complejo de esclerosis tuberosa 2 (TSC2), suprimiendo el efecto inhibitor del complejo TSC1-TSC2 en mTOR. Esto hace que se produzca la hiperactivación de la vía mTOR, que inhibirá la entrada de insulina en la célula porque inhibe IRS a través del S6K y NFL por lo que favorece la RI. Además mTOR favorece directamente la degradación de IRS-1 (Tanti y Jager, 2009). Así, al actuar el AMPK inhibiendo al mTOR se evita la inhibición de IRS por NFL. La importancia biológica del aumento transitorio del AMPK por la insulina puede estar en que actúa como mecanismo secundario que inhibe la hipersecreción de mTOR, uniéndose a la acción del NFL, y ser un mecanismo frente al estrés celular incrementado transitoriamente por la insulina. En cualquier caso, si existe déficit de AMPK se favorece la RI puesto que mTOR estaría activo e inhibiría a IRS.

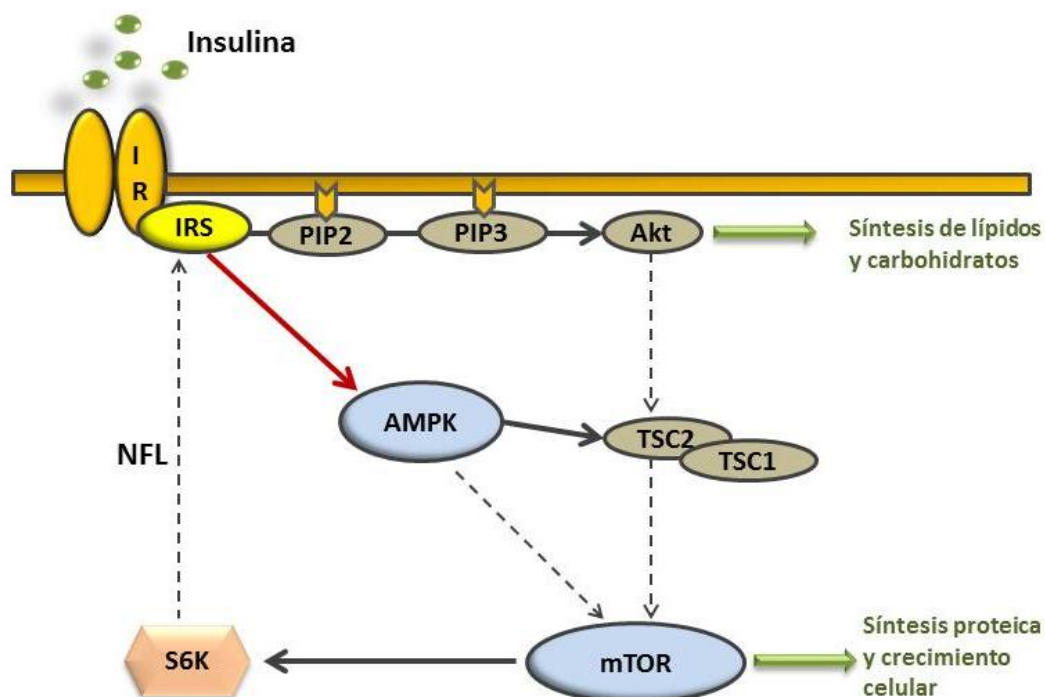


Figura. 2.3.6.2. Representación esquemática de la vía mTOR inducida por la insulina, incluyendo la inducción AMPK IRS-dependiente. Modificado de Sonntag y cols., 2012.

2.4. SELENIO Y SELENOPROTEÍNAS

El Se es un elemento traza esencial para la salud del ser humano ya que es crucial para el metabolismo de las hormonas tiroideas, el desarrollo cerebral, la fertilidad masculina, los sistemas de defensa antioxidante, el sistema inmune y la prevención de ciertos tipos de cáncer (Benstoem y cols., 2015).

Este mineral está presente en muchos alimentos como pan y cereales, carne, pescado, huevos y productos lácteos. Las recomendaciones diarias de Se son aproximadamente 55 µg/día en adultos, mientras que en bebés y niños se sitúan entre 15 y 30 µg/día, respectivamente. En cuanto a las recomendaciones de ingesta de Se durante la gestación y la lactancia se han encontrado datos contradictorios, aunque todos consideran que debe aumentarse su consumo. Así, en las mujeres embarazadas el consumo de Se debe ser de aproximadamente unos 65 µg/día y en las madres lactantes unos 75 µg/día (Carreras y cols., 2015).

La deficiencia de Se se ha relacionado con un aumento en el riesgo de infección, infertilidad masculina, bajo estado de ánimo, una mayor incidencia de cáncer, y la enfermedad de Keshan, una cardiomiopatía pediátrica localizada en China (Pappas y cols., 2008). Sin embargo, a pesar de utilizarse al Se como suplemento dietético con actividad antioxidante, un exceso de este nutriente en la dieta causa también serios problemas de salud afectando, entre otras cosas, a la integridad del ADN, por lo que su ingesta se considera un arma de doble filo (Brozmanová y cols., 2010)

Los efectos biológicos del Se son mediados por determinadas proteínas que contienen, al menos, un residuo de Se-Cys en su centro activo y reciben el nombre de selenoproteínas. Estas selenoproteínas son sintetizadas en distintos tejidos, siendo el hígado su principal órgano productor.

En el genoma humano se han identificado 25 genes que codifican las selenoproteínas, las cuales participan en múltiples procesos fisiológicos. Así, la familia de las GPxs forman parte del sistema antioxidante endógeno del organismo (Pappas y cols., 2008); la tioredoxina reductasa (TrxR) está implicada en la reducción de nucleótidos durante la síntesis de ADN; la iodotironina deiodinasa (DIO) lleva a cabo la conversión periférica de T4 en T3 activa (Dodigs y Cepelak, 2004); y la SelP es la responsable del transporte de Se desde el hígado a los tejidos (Burk and Hill, 2005).

La cantidad de Se biológicamente activo o el estado de Se se establece en base a cuatro componentes principales: la ingesta de Se, el Se en los tejidos, la excreción de Se y el Se funcional. La medida de las selenoproteínas proporciona información relevante de la función fisiológica del Se. Así, las selenoproteínas principalmente utilizadas en animales como biomarcadores del Se funcional son la GPx1 y GPx3, mientras que en humanos están más limitadas por su accesibilidad en los tejidos, siendo, por tanto, la GPx3 y la SelP, ambas presentes en el plasma, las más utilizadas (Combs, 2015).

2.4.1. GLUTATION PEROXIDASAS

La familia de la GPx comprende al menos 8 miembros (GPx1-GPx8) y son consideradas las proteínas más importantes de todas las selenoproteínas (Benstoem y cols., 2015). Estas selenoproteínas son enzimas con actividad antioxidante que se localizan en distintos compartimentos, dentro y fuera de la célula, y presentan distinta especificidad por los sustratos hidroperoxidados.

Entre ellas, la GPx1 es una enzima antioxidante que cataliza la reducción del H_2O_2 y los hidroperóxidos lipídicos, utilizando el GSH como reductor, para producir agua y alcoholes. Esta selenoproteína se localiza en el citosol celular y se encuentra distribuida por todo el organismo. Además, es una proteína muy sensible a los cambios en el estado de Se, ya que es una de las selenoproteínas que primero desaparecen durante la deficiencia de este nutriente (Barnes y cols., 2009). La síntesis de la GPx1 se reduce en condiciones de estrés como forma de reserva de recursos celulares y su recuperación se produce de forma más rápida que para otras selenoproteínas (Reeves y Hoffmann, 2009).

La GPx2 se expresa, principalmente, en el tracto gastrointestinal y actúa como primera línea de defensa frente al estrés oxidativo producido por la ingesta de alimentos.

Por su parte, la GPx3 se sintetiza en el riñón, siendo por tanto, muy abundante en este tejido, pero además, también está presente de manera destacada en el corazón. Esta selenoproteína se encuentra en el espacio extracelular y el plasma, conteniendo alrededor del 10-25% del Se total del plasma (Combs, 2015). Al igual que todas las isoformas GPx, la GPx3 tiene actividad antioxidante, protegiendo del H_2O_2 y los hidroperóxidos lipídicos que se encuentre, sin embargo, tiene una actividad mucho menor que la GPx1 (unas 10 veces menos) (Carreras y cols., 2015).

La GPx4 está presente en las membranas celulares ya que es la única enzima de la familia GPx capaz de detoxificar los hidroperóxidos lipídicos presentes en la membrana plasmática. Esta enzima también se conoce como GPx de fosfolípidos hidroperoxidados y recientemente se ha relacionado con el

factor de transcripción NF B y la apoptosis celular. La GPx4 además, es una enzima esencial para la vida ya que su ausencia produce mortalidad embrionaria temprana (Liang y cols., 2009).

La GPx6 se encuentra en humanos aunque no aparece en ratas ni ratones y se expresa en el epitelio olfatorio y en el tejido embrionario.

El resto de GPx (GPx5, GPx7 y GPx8) contienen un aminoácido de Cys en lugar del aminoácido de Se-Cys que contienen todas las selenoproteínas, presentando además, menor actividad antioxidante.

2.4.2. TIORREDOXINA REDUCTASA

La TrxR son enzimas que regulan numerosos procesos redox en las células, incluyendo la señalización y comunicación celular así como el metabolismo y la reparación del ADN.

Se han identificado tres miembros de esta familia, la TrxR1 que se localiza en el citosol, la TrxR2 presente en la mitocondria y la TrxR3 situada en los testículos. Estas selenoproteínas tienen una función antioxidante, manteniendo un ambiente reducido en el interior celular y están implicadas en la reducción de los nucleótidos durante la síntesis de ADN al transferir los electrones a la ribonucleótido reductasa (Maulik y Das, 2008).

2.4.3. IODOTIRONINA DEIODINASA

La familia DIO son enzimas oxidoreductasas involucradas en el metabolismo de las hormonas tiroideas, ya que deiodinizan estas hormonas (Schomburg y Köhrle, 2008). Presenta tres isoformas (DIO1, DIO2 y DIO3) localizadas en la membrana plasmática y en el retículo endoplasmático de una amplia variedad de tejidos en fetos y adultos, aunque aparecen deficientes en las células inmunes.

Estas enzimas catalizan la liberación del yodo de las hormonas tiroideas y convierten la hormona T4 en T3 activa. Además, por la acción de

determinadas proteínas, las DIOs pueden modular su función e inactivar las hormonas tiroideas que llegan a un tejido cuando no son necesarias (Schomburg y Köhrle, 2008).

2.4.4. SELENOPROTEÍNA P

La SelP es una proteína que se produce y excreta en el hígado, siendo junto con la GPx1 y GPx4, las selenoproteínas más abundantes de este tejido. Pero además, la SelP también se expresa en otros tejidos como corazón, riñón, cerebro, testículos y sistema digestivo y se ha encontrado asociada a células endoteliales (Moschos, 2000).

La selenoproteína P actúa como transportador de Se a los tejidos periféricos, conteniendo alrededor del 60-70% del Se total del plasma (Combs 2015). Esta proteína, que tiene 10 residuos de Se-Cys en su estructura (Saito y cols., 2004), funciona como antioxidante extracelular asociada al endotelio vascular, que inhibe la actividad de radicales libres como el peroxinitrito y reduce los fosfolípidos hidroperóxidos actuando en asociación con el GSH o la tioredoxina (Andoh, 2005). Recientemente, se ha identificado a la selenoproteína P como una hepatokina que produce RI y altera el metabolismo de la glucosa en el hígado y el músculo esquelético en humanos (Misu y cols., 2010).

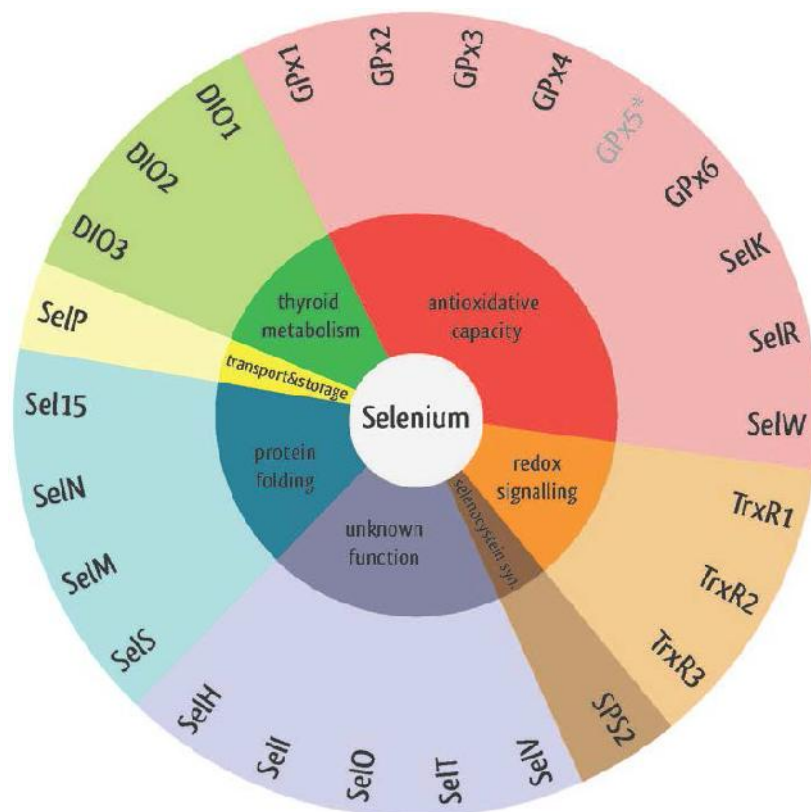


Figura 2.4.4. Principales selenoproteínas y sus funciones. Tomada de Benstoemd y cols., 2015.

2.5. SELENIO Y ESTRÉS OXIDATIVO

El Se es un elemento traza con actividad antioxidante porque forma parte de selenoproteínas como las GPxs, SelP y las TrxRs, todas con la capacidad de detoxificar algunas de las ROS. La Tabla 2.5. muestra las selenoproteínas más importantes que presentan actividad antioxidante.

Son muchos los estudios que proponen la suplementación con Se como un mecanismo capaz de incrementar la defensa antioxidante del organismo, protegiéndolo del estrés y del daño oxidativo generado por los radicales libres y las ROS (Ojeda y cols., 2009a, 2009b, Ojeda y cols., 2012; Xiao y cols., 2015). Así, se ha demostrado que una dieta rica en Se incrementa la actividad de las enzimas antioxidantes, principalmente la de GPx, aunque también modula la actividad del resto de enzimas del sistema de defensa antioxidante endógeno, como la SOD, la GR y la CAT (Ojeda y cols., 2009a, 2009b, Ojeda y cols., 2012). Del mismo modo, se ha observado que la deficiencia de Se induce EO y que la ausencia de protección antioxidante por parte de la selenoproteína GPx

es la causa de la patogénesis en las enfermedades relacionadas con la deficiencia de este nutriente (Ghazi Harsini y cols., 2012).

Tabla 2.5. Principales selenoproteínas con actividad antioxidante presentes en el organismo.

Selenoproteína	Función	Localización	Expresión
GPx1	<ul style="list-style-type: none"> Principal enzima antioxidante Detoxifica el H_2O_2 y los hidroperóxidos 	Citosol	Ubícu
GPx3	<ul style="list-style-type: none"> Detoxifica el H_2O_2 y los hidroperóxidos Señalización redox 	Extracelular (plasma)	Riñón, Corazón, otros
GPx4	<ul style="list-style-type: none"> Reduce los fosfolípidos hidroperoxidados Señalización redox 	Citosol Membrana Mitocondria	Hígado, Riñón, otros
SelP	<ul style="list-style-type: none"> Enzima antioxidante del endotelio 	Extracelular (plasma)	Hígado, Cerebro, otros

En base a esto se ha establecido una jerarquía para las selenoproteínas en función de su actividad respecto a los depósitos de Se existentes. Así, si existe una deficiencia de Se, de modo que no pueden expresarse todas las selenoproteínas, se produce una regulación, a la baja, en la síntesis de algunas de ellas, mientras que, supuestamente, aquellas selenoproteínas que realizan funciones más importantes, mantienen niveles altos de expresión (Burk y Hill, 2015). Barnes y cols. (2009) demostraron que la deficiencia de Se produce una rápida disminución de los mRNA de la GPx1 en riñón, hígado y músculo, así como de la GPx3 en plasma. Estos autores concluyen que estas proteínas son las que se encuentran más bajas dentro de la jerarquía de las selenoproteínas, siendo la GPx1 la primera que desaparece. Sin embargo, incluso cuando hay una deficiencia severa de Se, la expresión de la GPx4 se mantiene, ya que esta selenoproteína es esencial para la vida, encontrándose por ello, en los niveles más altos de la jerarquía (Burk y Hill, 2015). Por su parte, la SelP también se encuentra dentro de los primeros puestos ya que su expresión permanece incluso en condiciones de deficiencia severa (Burk y Hill, 2005).

Por todo ello, a nivel antioxidante se podría esperar que una disminución de los depósitos tisulares de Se, provocara inicialmente una disminución de la expresión y actividad citosólica de GPx1 que evitaría el paso del agua oxigenada hasta agua. El aumento de esta ROS favorece el EO. La GPx1 se expresa en prácticamente todos los tejidos, siendo este efecto, por tanto importante a nivel fisiológico, afectando además a la actividad de las otras tres enzimas endógenas del organismo: SOD, CAT y GR. Si el déficit de este nutriente es más severo, aparecerán mayores problemas a nivel antioxidante, pues se van ampliando progresivamente, en función de su jerarquía, el número de GPx afectadas.

Por el contrario, un aumento de los niveles de Se aumentaría la actividad de estas enzimas antioxidantes, empezando por la GPx1 que es la más sensible a depleciones y repleciones de Se. Esto mejoraría la acción antioxidante de esta enzima y el balance oxidativo.

2.6. SELENIO, SÍNDROME METABÓLICO Y RESISTENCIA A LA INSULINA

Aunque inicialmente la comunidad científica pensaba que un déficit de Se estaba relacionado con la aparición de DM2 y su suplementación era beneficiosa (Kljai y Runje 2001), estudios posteriores relacionaron elevados niveles séricos de Se con RI (Stranges y cols. 2007). Por ello, actualmente se considera que el Se juega un papel dual en la RI y el SM (Arnaud y cols., 2012).

Se ha comprobado que una dieta enriquecida con Se (3 p.p.m.) provoca RI en animales al aumentar la expresión de diversas selenoproteínas, destacando entre ellas la GPx1 (Zhou y cols., 2013). En humanos, niveles elevados de Se séricos están correlacionados con el SM, efecto que es más prominente en mujeres que en hombres (Yuan y cols., 2015), e incluso mayor actividad sérica de GPx se ha encontrado en pacientes con SM (Pinzent y cols., 2010).

Estudios más específicos, realizados por Steinbrenner y cols. (2011), han demostrado que, efectivamente, la expresión de GPx1 está aumentada en personas que presentan RI. Parece por tanto, como defienden Wang y cols (2014), que el Se está relacionado con la RI, a través de la acción antioxidante de la GPx1, pues aunque a priori la acción antioxidante a nivel hepático de esta enzima debería ser beneficiosa en el SM, patología donde existe EO, también actúa disminuyendo el H_2O_2 intracelular, necesaria en la cascada de señalización de la insulina.

Este mecanismo de acción propuesto para la GPx1 como inductora de la RI, se basa en que la insulina al entrar en contacto con su receptor, estimula a la enzima NAD(P)H oxidasa (Nox) generando anión superóxido que por acción de la enzima antioxidante SOD se transforma en H_2O_2 . Esta ROS generada estimula la cascada de señalización de la insulina al inactivar al PTP-1B y al PTEN, ambas proteínas inhibidoras de la cascada de señalización iniciada por la insulina (Figura 2.6) (Briguelius-Flohé y Maiorino, 2013).

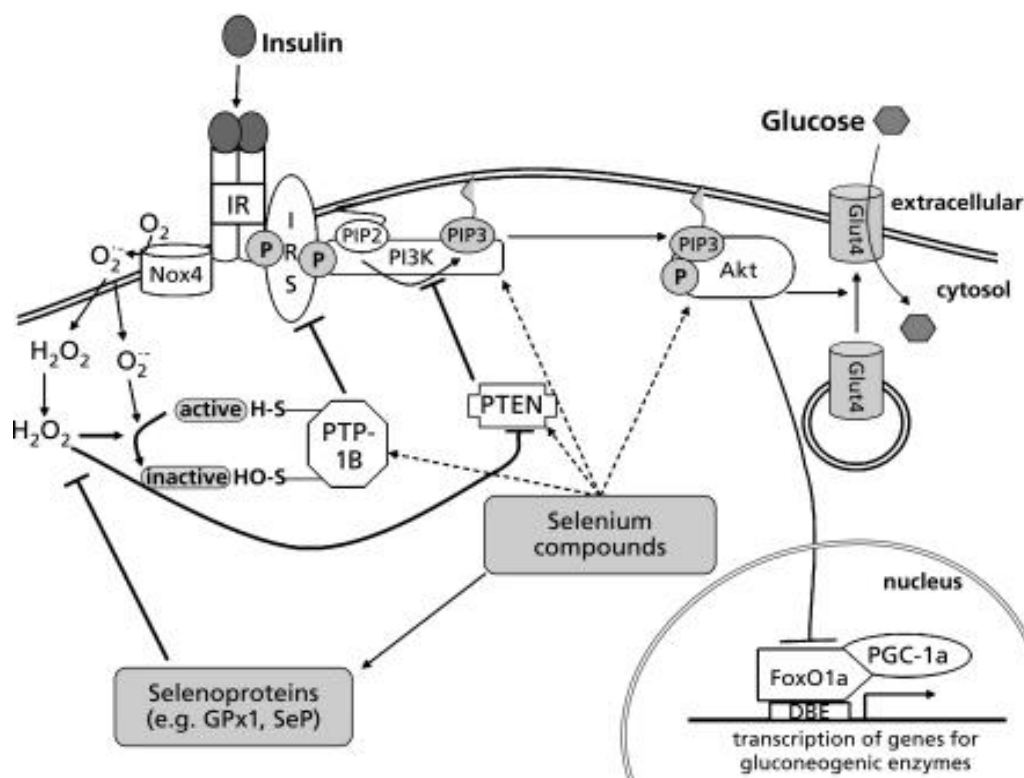


Figura 2.6. Posibles mecanismos que relacionan las selenoproteínas y selenocompuestos con la cascada de señalización de la insulina. Tomado de Steinbrenner y cols., 2011.

Por tanto, la acción de la GPx1 catabolizando el paso de H₂O₂ a agua, hace que permanezcan activos los inhibidores de la señalización PTP-1B y PTEN, dificultando claramente la acción de la insulina, y favoreciendo la RI. En consonancia con esta teoría, Steinbrenner (2013) sostiene que, además, GPx1, SelP y otros selenocompuestos pueden estar actuando inhibiendo la fosforilación (activación) de proteínas mediadoras claves en el metabolismo como Akt en hígado y músculo (Figura 2.6).

Por otro lado, diversos estudios relacionan a la SelP con el desarrollo de RI por un mecanismo directo. Así, se ha encontrado niveles séricos de SelP elevados en pacientes con SM (Rayman y cols., 2012). En esta línea Yang y cols. (2011) encontraron niveles de SelP elevados en pacientes con SM, mostrando además, que dichos valores estaban relacionados con parámetros cardiometabólicos relacionados con el metabolismo de la glucosa (Misu y cols., 2010). Estos mismos autores, han demostrado que la SelP causa RI, al menos en parte, mediante la inactivación de la AMPK, enzima crítica en el balance energético, que aumenta su actividad cuando se requiere energía. En dichas situaciones, la AMPK inhibe los caminos que antagonizan las señales de la insulina, inhibiendo a mTOR, que a su vez inhibe a IRS, así el AMPK favorece la acción de la insulina (Kahn y cols. 2005) (Figura 2.3.5.2). Por ello, la inactivación de la AMPK por parte de la SelP, provoca una mayor resistencia a la acción de la insulina al mantenerse activo el mTOR.

Si bien parece que el mecanismo de acción de las selenoproteínas sobre la RI está empezando a conocerse, no se debe perder de vista que un déficit de Se está también asociado a DM2 (Stapleton, 2000; Zhou, 2013). En este contexto, Seale y cols., (2012) encontraron que cuando el Se en la dieta está restringido y los procesos celulares de su reciclado ausentes, se instaura el SM. En este caso, las selenoproteínas GPx1 y SelP estaban disminuidas y los inhibidores de la cascada de señalización de la insulina aumentados, confirmando que una disminución de los niveles de Se y de la expresión de selenoproteínas también alteran el metabolismo energético.

Contribuyendo a este puzzle de selenoproteínas implicadas en la RI y el SM, en estudios epidemiológicos, variantes del gen *gpx4* en humanos se han

asociado con obesidad y enfermedad cardiovascular (Ruperez y cols., 2014; Crosley y cols., 2013). En este contexto, Katunga y cols., (2015), han encontrado que una deficiencia en la actividad GPx4 en obesos da lugar a un incremento de la oxidación de lípidos y proteínas hepáticas, incrementando la RI y la esteatosis. Estos autores sugieren por primera vez, que los peróxidos lipídicos y sus aldehídos reactivos derivados son un factor determinante en el desbalance cardiometabólico que ocurre durante la obesidad, y que la GPx4 juega un papel crítico como posible respuesta adaptativa frente a este hecho.

Por todo lo expuesto, se ha demostrado que una alta expresión de selenoproteínas, así como su deficiencia, alteran la homeostasis de glucosa sugiriendo una relación directa de las selenoproteínas con la RI y el SM (Labunsky y cols., 2011). Sin embargo, no hay trabajos que analicen la homeostasis de Se durante el SM.

2.7. LA INDUCCIÓN DEL SÍNDROME METABÓLICO CON LA INGESTA DE UNA DIETA RICA EN FRUCTOSA

El consumo de fructosa ha incrementado, marcadamente, durante las últimas décadas, sobre todo en forma de jarabe de maíz rico en fructosa o como sacarosa, los cuales son adicionados para edulcorar a las bebidas gaseosas, zumos y alimentos azucarados. Así, desde 1978 el consumo de fructosa ha incrementado desde 0.5 hasta 52.4 g diarios (Marriott y cols., 2009).

La fructosa es un azúcar simple presente en frutas y miel, responsable de su sabor dulce. Sin embargo, la principal fuente de fructosa es el disacárido sacarosa o azúcar de mesa, el cual se obtiene de la caña de azúcar y la remolacha azucarera y está formado por una molécula de fructosa y otra de glucosa.

A pesar de la similitud de sus estructuras químicas, la fructosa y glucosa se metabolizan de forma diferente y utilizan diferentes transportadores GLUT. A diferencia de la glucosa, la fructosa no estimula la secreción de insulina, debido

a su metabolismo hepático y al bajo nivel de expresión del transportador de fructosa GLUT5 en las células β pancreáticas (Khitan y Kim, 2013).

Aunque se creía que la fructosa entraba en el epitelio intestinal por transporte activo, Sloboda y cols., (2014) concluyeron que en humanos, la entrada de fructosa en las células se produce por difusión facilitada por las proteínas GLUT5 y GLUT2, siendo el primero exclusivo para fructosa.

En el hígado, la fructosa no pasa por los dos pasos altamente regulados de la glucólisis, catalizados por la enzima glucoquinasa/hexoquinasa y fosfofructoquinasa, los cuales son inhibidos por concentraciones crecientes de sus subproductos. En lugar de ello, como describen Khitan y Kim (2013) la fructosa entra en la ruta a un nivel que no está regulado y es metabolizada a la fructosa-1-fosfato principalmente por fructoquinasa o ketohexokinasa (KHK) que es la primera enzima que usa el cuerpo para metabolizar la fructosa. Esta metabolización se produce principalmente en el hígado, de una forma rápida y produciendo una disminución del fosfato intracelular y los niveles de ATP (Johnson y cols, 2013). Ambos procesos se muestran en la Figura 2.7.1.

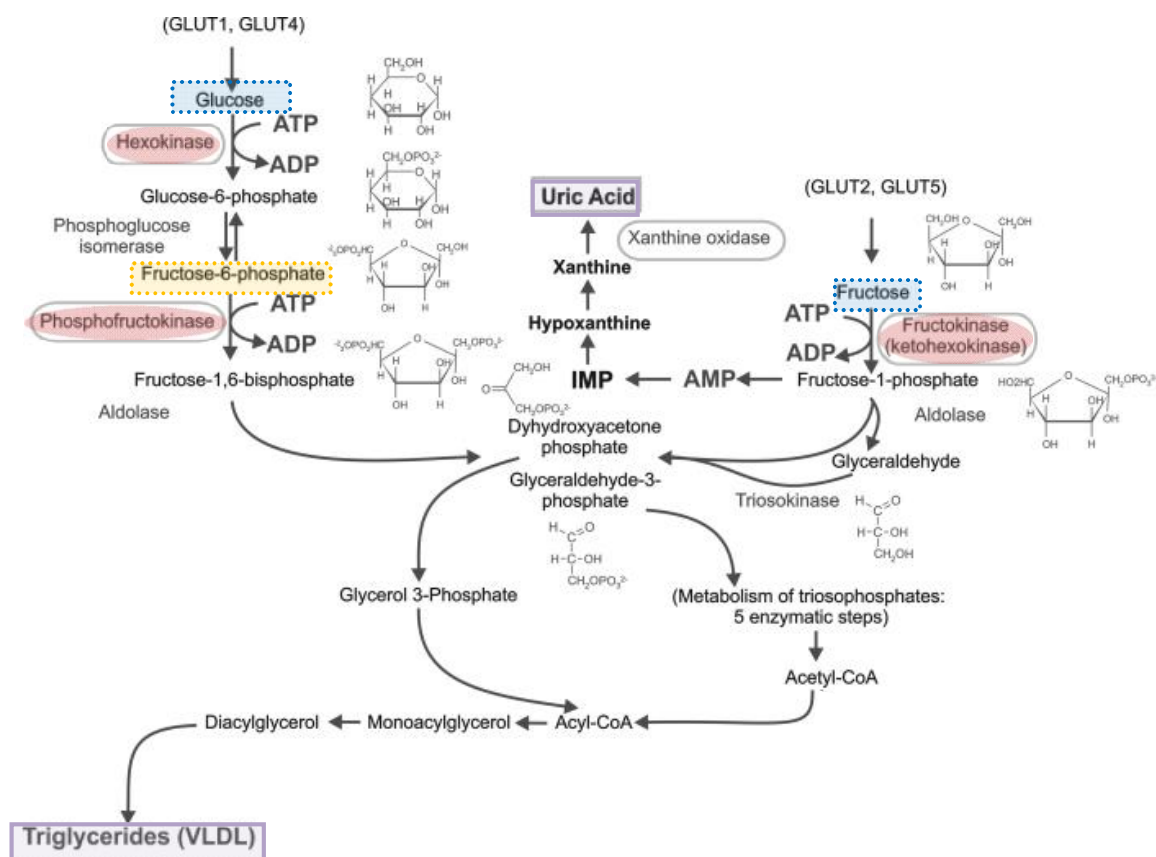


Figura 2.7.1. Metabolismo de la glucosa y fructosa. La fructosa se puede degradar por dos vías, una proveniente de la glucosa, por medio de las enzimas hexoquinasa y fosfofructoquinasa y la otra, por medio de la fructoquinasa (KHK). En este último caso, que es el más frecuente en el hígado, aumenta la producción de ácido úrico. Tomado de nutricaoeovanaebaid.blogspot.com.

La enzima KHK no tiene un sistema de retroalimentación negativa, y utiliza ATP para el proceso de fosforilación. Como resultado del metabolismo de fructosa se produce una depleción intracelular de fosfato y la activación de AMP deaminasa, generándose ácido úrico, como muestra la Figura 2.7.1, que se libera al torrente sanguíneo (Johnson y cols., 2013; Khitan y Kim, 2013). Así, los niveles séricos de ácido úrico aumentan rápidamente después de la ingestión de fructosa y, según demuestran en sus estudios Khitan y Kim (2013), estimula la expresión de KHK, inhibe NO endotelial in vivo e in vitro, induciendo directamente la disfunción de los adipocitos. Esa disminución de la producción de NO contribuye a la vasoconstricción renal que provoca hipertensión, aumento de la inflamación y la activación del sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona. Estos mismos autores concluyen que el metabolismo de la fructosa conduce a la hipertrigliceridemia postprandial, lo que aumenta la adiposidad visceral y produce acumulación hepática de triglicéridos (Figura 2.7.1). Pero además, la fructosa estimula la lipogénesis de novo hepática en ratas (Carmona y Freedland, 1989) y en humanos (Faeh y cols., 2005) e inhibe la oxidación hepática. Esto resulta en la síntesis de AGL, VLDL y colesterol, y contribuye además, a la aparición de RI, dislipidemia y la activación de la proteína quinasa C.

Los ratones son relativamente resistentes a la fructosa, en parte, porque generan menos ácido úrico en respuesta a la fructosa debido a la presencia del gen de la uricasa en el hígado. Esta enzima degrada el ácido úrico a alantoína, y como consecuencia, en las ratas se degrada el ácido úrico rápidamente. Johnson y cols., (2013) demostraron que cuando la uricasa es inhibida, las ratas muestran una mayor respuesta metabólica a la fructosa con un aumento del hígado graso y de presión arterial y concluyeron que la elevación del ácido úrico en suero es uno de los mejores predictores de la hiperinsulinemia que suele preceder al desarrollo de RI y diabetes.

Además, la fructosa puede aumentar el riesgo de obesidad mediante la alteración de la sensación de saciedad, pues provoca resistencia a la hormona saciante, leptina, así como aumento de peso en las ratas (Rodríguez y cols., 2015b; Sloboda y cols., 2014). La fructosa también estimula la ingesta de

alimentos debido a la estimulación de la dopamina en el sistema mesolímbico y los efectos sobre el hipotálamo (Johnson y cols., 2013).

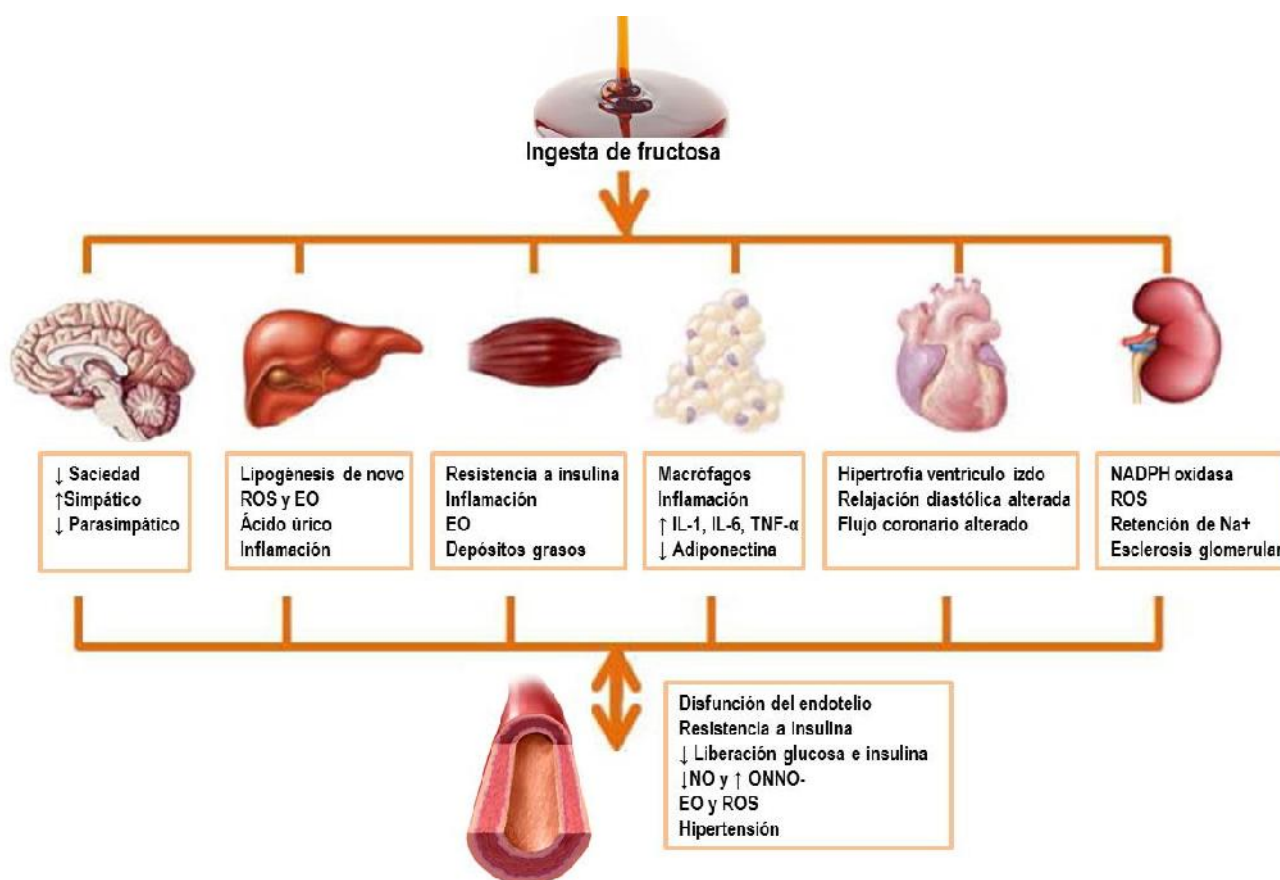


Figura 2.7.2. Efectos de ingesta elevada de fructosa. Tomado de Jia y cols., 2014.

Son varios los estudios que consideran que la alimentación con una dieta que contenga una alta concentración de fructosa (65%) durante 2-4 semanas, es muy útil para conseguir un modelo de SM en ratas (Basciano y cols., 2005; Kim y cols., 2010; Abdulla y cols., 2011; Kitagawa y cols., 2012), y que el resultado es mejor si se introduce en la dieta sólida que en el agua de bebida (Abdulla y cols., 2011). Ya en la década de 1950, estudios experimentales mostraron la capacidad de la fructosa para inducir RI en ratas de laboratorio (Johnson y cols, 2013).

Hoy en día se ha demostrado que la ingesta de fructosa induce todas las características del SM en ratas, así como el EO, la disfunción endotelial, hígado graso, hipertrigliceridemia, microalbuminuria, enfermedad renal, dislipemia, hipertensión, obesidad, hiperuricemia y riesgo cardiovascular (Johnson y cols.,

2007; Dekker y cols., 2010; Johnson y cols., 2013) y que también está asociada a un aumento del EO por generación de ROS, que son responsables de la peroxidación lipídica y conlleva al daño vascular y defectos en los sistemas antioxidantes (Delbosc y cols., 2005). En contraste, la ingesta de glucosa o almidón en cantidades equivalentes produce como resultado un menor número de características del SM.

Aunque Sloboda y cols., (2014) demostraron que el consumo de glucosa aumenta la capacidad de absorción de fructosa, las ratas alimentadas con fructosa sufren una disminución de la liberación de glucosa del hígado en respuesta a la insulina, característica en RI.

En conclusión, y como se demuestra con todo lo anterior, la ingesta de una dieta rica en fructosa provoca HTA (Sánchez-Losada y cols., 2008), aumento de tamaño de los adipocitos, eleva los niveles séricos de adipocinas (Alzamendi y cols., 2012), glucosa, insulina, TG, colesterol total, AGL, ácido úrico, leptina, peroxidación lipídica y el peso del hígado, índices todos ellos de RI y SM (Zou y cols., 2012; Kitagawa y cols., 2012).

Por todo ello, tomando estos modelos se utilizará, en la presente memoria, un aporte de un 65% de fructosa en la dieta para inducir el SM en los animales de experimentación.

2.8. PROGRAMACIÓN METABÓLICA FETAL

El estado nutricional de la mujer antes y durante la gestación es importante no sólo para la buena salud de la madre y del feto, sino que también influye sobre el crecimiento y el desarrollo del neonato, e incluso sobre la salud del futuro adulto, como defiende la teoría del “fetal programming” (Fowden y Forhead 2004).

En el año 2000, Godfrey y Barker sugirieron que muchas de las enfermedades crónicas que se sufren durante la edad adulta, tienen su origen en un mal desarrollo durante la etapa intrauterina. Esto lo achacan a una mala programación en esta etapa vital y sensible, donde un estímulo provoca

cambios que dejarán efectos permanentes en la estructura, fisiología y metabolismo del individuo. Estos autores demostraron, en concreto, que los individuos con enfermedades coronarias, hipertensión y diabetes, en una amplia mayoría, mostraban bajo peso al nacer independientemente del tiempo de gestación, indicando que esta relación estaba implicada en los problemas de crecimiento intrauterino. Así, llegaron a la conclusión de que la dieta materna durante la gestación juega un papel relevante para la futura salud de su descendencia.

Otros autores extienden este periodo hasta el final de la lactancia, donde la madre proporciona nutrientes al neonato, y sufre cambios metabólicos importantes para cubrir las demandas de ambos (Stuebe, 2015). Así, el periodo posnatal inmediato se considera también un periodo vulnerable para la programación permanente de la dinámica del apetito y el crecimiento y por ello requiere ser valorado para la futura salud del individuo (Patel y Srinivasan, 2011).

En este sentido, respecto al elemento objeto de este estudio, el selenio, se ha demostrado, en ratas, que una dieta rica en Se (0.5 p.p.m.) durante la gestación y la lactancia provoca un incremento de peso en las crías al nacer y al final de la lactancia (Nogales y cols., 2013). Además, al final de la lactancia, estas crías presentaron un aumento de los niveles de colesterol y triglicéridos séricos, unido a un aumento de la actividad GPx en hígado, así como un aumento de la expresión de la GPx1, GPx4 y SelP relacionadas todas estas selenoproteínas con la aparición de RI (Jotty y cols., 2013). Por el contrario, un déficit de este nutriente durante la gestación y lactancia aumenta la mortalidad neonatal, produce bajo peso al nacer y un menor desarrollo hepático con menor actividad GPx y aumento de la oxidación proteica. Sin embargo, también provoca alteraciones en los niveles de glucosa y triglicéridos séricos de las crías (Nogales y cols., 2013).

Más a largo plazo Zeng y cols. (2012), han demostrado en crías adultas de madres expuestas a una dieta rica en Se (3.0 mg/kg dieta), y que mantuvieron esta dieta durante la etapa adulta, la existencia de hiperinsulinemia y RI, que coinciden con alteraciones del mRNA y/o expresión

de proteínas de la cascada de señalización de la insulina en hígado y músculo. En concreto, en el hígado de estas ratas se ha encontrado una disminución de la expresión genética de IRS-1 y Akt-2. Además también se ha encontrado un aumento significativo de la actividad GPx hepática.

Por otro lado, en obstetricia, las madres que presentan SM o DM2 durante la gestación, se consideran de alto riesgo, pues tienen más probabilidades de tener complicaciones durante la gestación, como preeclampsia, diabetes gestacional, enfermedad cardiovascular, crecimiento intrauterino retardado, e incluso muerte fetal (Gallo y cols., 2010), pero además, cada vez hay más evidencia de que los efectos adversos de este síndrome se pueden transmitir a la descendencia y mantener incluso durante la etapa adulta (Rkhzay-Jaf y cols., 2012). De hecho, como se comentó en el apartado 2.1.1, se podría decir que hay una herencia del SM en la primera generación de descendientes de las mujeres que lo padecen (González-Bulnes y cols., 2014) y que estos efectos no se limitan a la primera generación de descendientes, sino que pueden afectar incluso a generaciones posteriores (Dabelea y Crume, 2011).

Así, en crías de ratas con SM inducido por una dieta rica en fructosa del 65% (similar a la usada en esta memoria), durante la gestación y la lactancia, se ha observado un menor peso al final de la lactancia y un menor IMC (Zou y cols., 2012).

Aunque hay estudios con dosis menores de fructosa administrada en solución que muestran en crías cambios metabólicos importantes al nacer (Mukai y cols., 2012, Vickers y cols., 2011), teniendo en cuenta que la dosis y la forma de administración de la fructosa genera diferentes cambios metabólicos (Sloboda y cols 2014), y existiendo evidencias de alteraciones hepáticas y metabólicas severas y específicas durante la lactancia en madres expuestas a una dieta rica en fructosa al 65%, pensamos que es interesante estudiar a las crías de este grupo como modelo experimental, del que poder obtener también información adicional, pues existen pocos datos al respecto durante la gestación y lactancia. En este sentido, Tain y cols., (2014 y 2015) con una dieta rica en fructosa al 60% durante la gestación y lactancia, han

demostrado que las crías adultas machos de 3 meses de edad sufren programación renal relacionada con la aparición de hipertensión.

Además, recientemente, se ha observado que una dieta rica en fructosa (entre el 10-20%) durante la gestación y la lactancia provoca diferentes alteraciones endocrinas en el neonato dependiendo del sexo de la progenie, siendo aparentemente las hembras más vulnerables al compromiso metabólico relacionado con la leptina y la insulina al nacer y durante la lactancia (Vickers y cols., 2011). Sin embargo, curiosamente en estudios a largo plazo sobre ratas adultas (261 días de edad) expuestas durante la gestación y lactancia a dieta rica en fructosa, se ha observado que las ratas machos tienen alteradas la cascada de señalización de la insulina, no así las hembras (Rodríguez y cols., 2015a, Rodríguez y cols., 2015b).

OBJETIVO

3. OBJETIVO

El SM está ligado al EO en diferentes tejidos, debido a que existe un aumento de las ROS y alteración de las enzimas antioxidantes como la SOD y la GPx, y que el EO es un mecanismo importante en el desarrollo de sus complicaciones. Por todo esto, se podría suponer que la suplementación dietética con Se podría tener efectos antioxidantes beneficiosos en esta patología al aumentar la actividad GPx. Sin embargo, se ha descrito una doble función del Se en la RI y SM. Así, un consumo supra-nutricional lleva a la RI en animales, por exceso de la actividad GPx opuesta a las ROS intracelulares implicadas en la cadena de señalización de la insulina. Por el contrario, la deficiencia de Se se asocia también con RI. Por tanto, actualmente los científicos defienden que la expresión máxima de selenoproteínas y/o su deficiencia promueven la aparición de RI y por ende, del SM.

Además, las madres gestantes y sobre todo las lactantes que padecen el SM, presentan cambios metabólicos diferentes, pues durante estos periodos vitales, en los que hay que alimentar a otro ser, el metabolismo basal está alterado fisiológicamente. Por ello, sería interesante analizar específicamente estas alteraciones con el fin de conocer la repercusión que tienen en las madres, y también en su descendencia, ya que de acuerdo con la teoría de la programación fetal, la progenie expuesta a desbalances metabólicos como el SM durante el embarazo y/o lactancia, están en riesgo de padecer alteraciones patológicas al nacer e incluso en su vida adulta. Además, se ha observado que estos cambios son diferentes en machos y hembras.

Por todo ello, el objetivo de este estudio es evaluar, por primera vez, la distribución corporal de Se en madres con SM y en su progenie al final de la lactancia, y analizar la relación de este micronutriente con el equilibrio oxidativo y el perfil metabólico, para ampliar el conocimiento sobre la posible función que el Se juega en esta patología. Dando prioridad al estudio, en las crías, de las selenoproteínas hepáticas implicadas en la RI (GPx1, GPx4 y SelP) en relación con la cascada de señalización de la insulina, analizando las posibles diferencias de género.

MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS:

4.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Para realizar este trabajo se utilizaron ratas Wistar machos (N= 6) y hembras (N=12), de unas 8 semanas de edad procedentes del Centro de Experimentación Animal y Producción, Vicerrectorado de Investigación, Universidad de Sevilla. Estas ratas, que pesaron alrededor de 175-200 g, fueron divididas al azar en dos grupos experimentales:

- **Grupo control (C):** ratas alimentadas con dieta básica y agua *ad libitum*;
- **Grupo con Síndrome Metabólico (F):** ratas alimentadas con una dieta rica en fructosa (65%), con la intención de inducirles un síndrome metabólico (Basciano y cols., 2005; Kim y cols, 2010; Abdulla y Cols, 2011; Alzamendi y cols., 2012; Kitagawa y cols., 2012) y agua *ad libitum*.

Las dietas suministradas a los grupos fueron dietas base semisintéticas preparadas por nuestro grupo de investigación de acuerdo con las recomendaciones de “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (ILAR, 2010), que cubren todas las necesidades nutricionales y de energía (4 kcal/g) de los animales y contienen 0,1 ppm de selenio en forma de selenito de sodio pentahidratado (PANREAC). La dieta del grupo F fue elaborada con un 65% de fructosa, en lugar de sacarosa y almidón, siguiendo las pautas de los estudios de Abdulla y cols. (2011) y presentó una consistencia melosa.

El período de experimentación se dividió en varias fases: **Fase de inducción:** comenzó con el tratamiento del grupo F con su dieta específica (rica en fructosa) con el fin de inducir un síndrome metabólico, mientras que el grupo C se alimentó con dieta control. Esta fase duró 3 semanas durante las cuales los animales se mantuvieron separados por grupo y género en jaulas de plástico; **Fase de gestación:** en ella, los machos y las hembras de cada grupo fueron cruzados en una relación de 1:2 por jaula, y se mantuvieron durante la cuarta y quinta semanas. Tras comprobar el embarazo por medio de la observación directa del tapón mucoso vaginal, las ratas gestantes se introdujeron en jaulas individuales hasta el parto; **Fase de lactancia:** empezó el día del parto, el cual fue designado como el día 1 del periodo de lactancia y

terminó el día 21. Desde el momento del parto y durante las 3 semanas de lactancia, las ratas hembras (6 por grupo) se mantuvieron en sus jaulas junto a sus crías, conservando las pautas de alimentación del grupo C y F. Tras el parto, el número de crías se redujo a 15 hembras y 18 machos en el grupo C, y 12 hembras y 13 machos en el grupo F. Los experimentos se realizaron en la descendencia de los dos grupos a los 21 días de lactancia.

Durante todo el proceso, los animales se mantuvieron a una temperatura controlada automáticamente (22-23°C) y ciclos de 12 horas de luz-oscuridad (09:00-21:00 h) de acuerdo con las normas éticas de experimentación con animales 86/609/EEC del Consejo Europeo.

4.1.1. ESQUEMA DEL DISEÑO EXPERIMENTAL

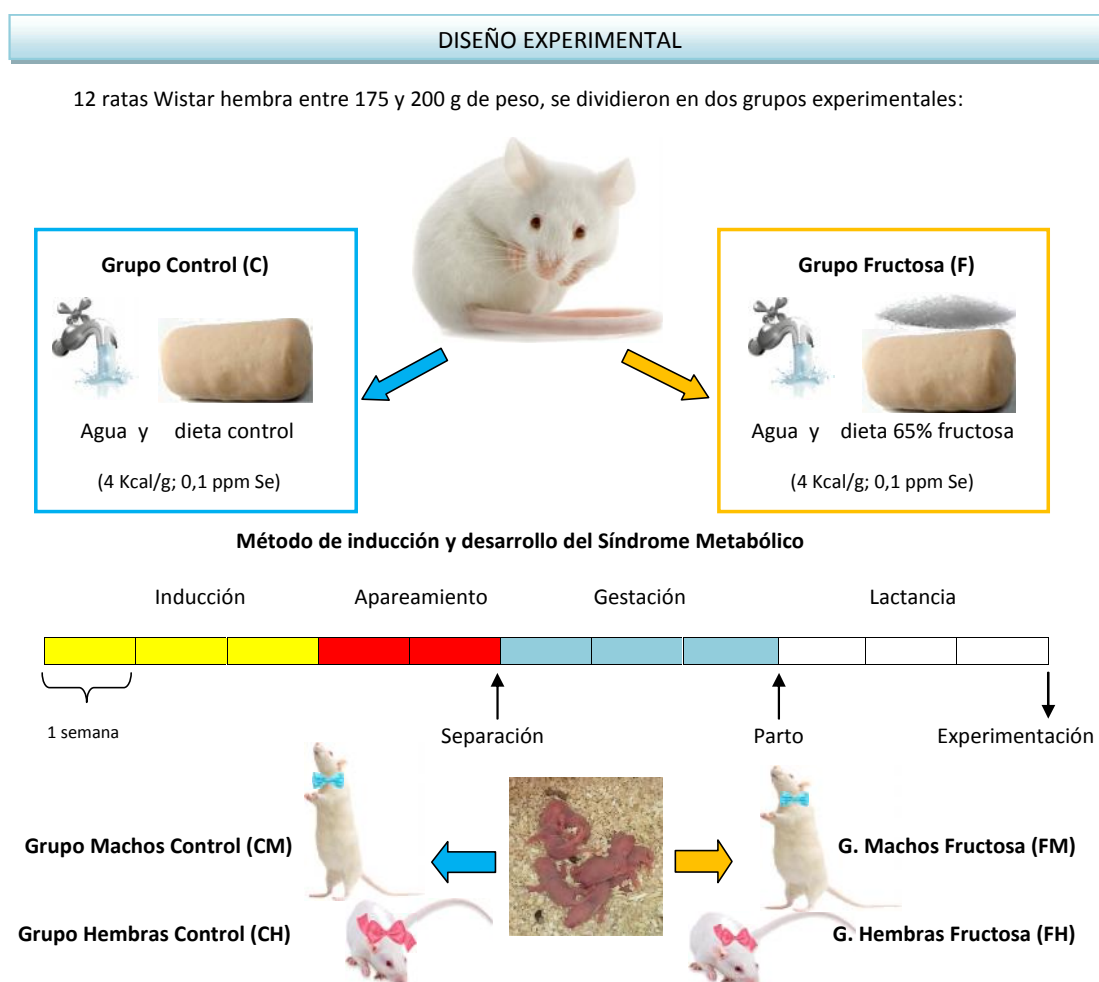


Figura 4.1.1.1. Diseño experimental.

4.1.2. DIETAS UTILIZADAS

Como ya se ha comentado, la alimentación suministrada a todos los grupos consistió en una dieta básica semisintética registrada en la Tabla 4.1.2.1, que cubre todas las necesidades nutricionales y energéticas, elaborada según las recomendaciones propuestas por “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (ILAR, 2010). La dieta rica en fructosa se realizó con un 65% fructosa, en sustitución de sacarosa y almidón.

La elaboración de la dieta básica se llevó a cabo mezclando todos los componentes (excepto el aceite de oliva, para evitar su oxidación) en orden de menor a mayor proporción de acuerdo con la regla de las diluciones seriadas. Para garantizar una buena homogeneización se utilizó una mezcladora de doble cono asimétrica (*RETSCH, HAAN, GERMANY*) a una velocidad de 50 r.p.m. durante 15 minutos por cada 5 kg de pienso preparado.

Tabla 4.1.2.1 Composición general de la dieta básica

Ingredientes	Dieta control (%)	Dieta rica en fructosa (%)
Caseína	20	20
Almidón de maíz	15	--
Sacarosa	50	--
Fructosa	--	65
Aceite de oliva	5	5
Bitartrato de colina	0,2	0,2
DL- Metionina	0,3	0,3
Mezcla vitamínica	1	1
Mezcla mineral	3,5	3,5
Celulosa	5	5

Tabla 4.1.2.2 Composición del corrector vitamínico (mg/kg o UI/kg) o mineral (mg/kg) de la dieta

Componente vitamínico	Cantidad	Componente mineral	Cantidad
Tiamina hidroclicóricó (B1)	6,0 mg	Calcio	5200,0 mg
Riboflavina (B2)	6,0 mg	Fósforo	4000,0 mg
Piridoxina hidroclicóricó (B6)	7,0 mg	Sodio	1020,0 mg
Ácido nicotínico	30 mg	Potasio	3600,0 mg
Pantotenato cálcico	16 mg	Magnesio	500,0 mg
Ácido fólico	2,0 mg	Manganeso	54 mg
Biotina	0,2 mg	Hierro	35,0 mg
Cianocobalamina	0,01 mg	Cobre	6,0 mg
Vitamina A	4000,0 UI	Zinc	30,0 mg
Vitamina D ₃	100000 UI	Yodo	0,2 mg
Vitamina E	50,0 UI	Selenio	0,1 mg
Vitamina K	0,05 UI	Cromo	2 mg
		Cloro	1560,0 mg
		Sulfato	1000,0 mg

El pienso en polvo resultante se conservó en lugar fresco, seco y protegido de la luz. Para suministrar a los animales la dieta en forma sólida, se mezcló proporcionalmente el pienso en polvo con el aceite de oliva, añadiendo una pequeña cantidad de agua para compactar la mezcla. La pasta obtenida se moldeó y dividió en pequeñas porciones, que una vez secas se conservan refrigeradas a 4°C hasta su utilización.

4.1.3. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS NUTRICIONALES (ANÁLISIS DE LOS FACTORES DE RIESGO RELACIONADOS CON EL SÍNDROME METABÓLICO)

4.1.3.1. Estudio nutricional y de la ingesta de selenio

El estado nutricional de los animales durante el periodo experimental, fue controlado semanalmente por medio de la ingesta sólida (g/día) y la ingesta líquida (mL/día) en cada grupo. Los datos de ingesta sólida se obtuvieron estableciendo la diferencia en peso entre las piezas de alimentos colocados inicialmente y las restantes después de una semana, para ello se utilizó una balanza analítica (COBOS D-2000-SX) de 0.1 g de precisión.

La ingesta líquida se determinó por la diferencia de volumen de líquido en los biberones al inicio y final de la semana. Las calorías diarias ingeridas en la dieta se calcularon multiplicando los gramos de ingesta sólida por las kcal que aportan los hidratos de carbono presentes en ella (4 kcal/g).

Los valores de selenio ingeridos por las ratas madres se calcularon multiplicando las ppm de selenio en la dieta (0.1 ppm) por los gramos de pienso ingeridos.

Todas las determinaciones se llevaron a cabo por la mañana para evitar diferencias debidas al ritmo circadiano, entre las 9:00 – 10:00 a.m.

4.1.3.2. Parámetros morfológicos

El peso corporal en las madres y en sus crías se determinó semanalmente, por la mañana, empleando una balanza analítica (COBOS D-2000-SX) de 0.1 g de precisión. Además, en el caso de las crías, también se determinó la longitud cráneo caudal utilizando un pie de rey métrico de precisión 0.01 mm. Estas determinaciones se realizaron durante todo el proceso en las madres, y en las crías el día correspondiente al nacimiento, y semanalmente, hasta llegar al final de la lactancia.

Una vez concluido el periodo experimental, los animales se pesaron antes de ser sacrificados y se anestesiaron vía intraperitoneal con uretano

(SIGMA) al 28 % p/v a razón de 0.5 ml/100 g de peso corporal. A continuación se determinó la circunferencia abdominal, la circunferencia torácica, la longitud corporal y el índice de masa corporal (IMC) (Novelli y cols., 2007) de las madres y sus crías, así como el índice organosomático (IOS) mediante la relación $IOS = (\text{peso del órgano/peso total}) \times 100$.

4.1.3.3. Parámetros gestacionales

Se examinaron el número total de apareamientos, gestaciones y partos, discriminando entre crías nacidas vivas y muertas. Además se calculó el Índice de fertilidad (IF), Índice de gestación (IG), Índice de nacidos vivos (INV), Índice de viabilidad (IV), e Índice de supervivencia lactante (IS), los cuales se expresan como un porcentaje (%), como se observa en la Tabla 4.1.3.3.

Tabla 4.1.3.3 Índices gestacionales y de supervivencia

	Cálculo
Índice de fertilidad (IF)	$(\text{N}^\circ \text{ de embarazos} / \text{n}^\circ \text{ de cruces}) \times 100$
Índice de gestación (IG)	$(\text{N}^\circ \text{ de partos con éxito} / \text{N}^\circ \text{ de hembras gestantes}) \times 100$
Índice de nacidos vivos (INV)	$(\text{N}^\circ \text{ de crías nacidas vivas} / \text{N}^\circ \text{ de crías nacidas}) \times 100$
Índice de viabilidad (IV)	$(\text{N}^\circ \text{ de crías vivas el día 7} / \text{N}^\circ \text{ de crías vivas el día 4}) \times 100$
Índice de supervivencia lactante (IS)	$(\text{N}^\circ \text{ crías totales} - \text{N}^\circ \text{ crías muertas} / \text{N}^\circ \text{ de crías totales}) \times 100$

4.1.3.4. Determinación del perfil lipídico y glucídico

Durante el tratamiento y el día del sacrificio se determinaron, a partir de sangre total extraída de la cola, los niveles de glucemia, colesterol total, y triglicéridos (Abdulla y cols, 2011; Lê y cols, 2009) de todas las ratas. Para la medición de estos parámetros se utilizó el dispositivo automático Accutrend® Plus (ROCHE) que utiliza tiras reactivas específicas para cada determinación. Los rangos de medición para cada uno de los parametros son: Glucosa, entre 20-600 mg/dL; Triglicéridos, entre 60-600 mg/dL; y Colesterol, entre 150-300 mg/dL.

4.1.3.5. Determinación de la Insulina y cálculo HOMAR

Para la determinación de la insulina se tomaron muestras de suero obtenidas tras el sacrificio, que fueron centrifugadas antes de las 2 horas de la extracción y que permanecieron congeladas a -80°C hasta el momento de su análisis.

Las muestras, de 200 µL cada una, se enviaron correctamente identificadas y acondicionadas a un laboratorio externo especialista en análisis de muestras procedentes de animales (Laboratorio de Análisis veterinarios Dr. Barba), donde las concentraciones de insulina de cada muestra se determinaron por ensayo de MICROELISA usando un procedimiento estandarizado que se basa en el kit de insulina DSL-10-1600 Active TM Diagnostic Systems Laboratories, Inc. (Webster, TX, USA) y el equipo lector de ELISA BIO-RAD modelo 3550. El kit DSL-10-1600 para la determinación de insulina ha sido utilizado en otros estudios para determinar las concentraciones de insulina de ratas Wistar diabéticas (Khanam y Pillai, 2006; Poveda y cols., 2008). El resultado se obtuvo en mUI/L.

El cálculo del índice HOMA IR (Homeostatic Model Assessment Insulin Resistance) se establece a partir de la relación entre la glucemia basal y los niveles de insulina sérica, evaluando el balance entre la producción hepática de glucosa y la secreción de insulina. Es el método más usado y publicado para determinar el grado de resistencia a la insulina. Los valores se han obtenido utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{HOMA IR} = \frac{\text{Insulina (mUI/L)} \times \text{glucosa (mg/dL)}}{405}$$

El porcentaje de células funcionales valora el balance entre la producción hepática de glucosa y la capacidad del páncreas para segregar insulina. Los valores se obtuvieron utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Células } \beta \text{ funcionales} = \frac{\text{Insulina (mUI/L)} \times 360}{\text{Glucosa (mg/dL)} - 63}$$

4.1.3.6. Determinación de la presión arterial y frecuencia cardiaca

El día anterior al sacrificio se midió la presión arterial sistólica y diastólica, y la frecuencia cardiaca de las ratas madres mediante el método indirecto de oclusión de la cola (Gómez-Amores y cols., 2007). Las mediciones se realizaron usando un Medidor de presión 645 NIPREM (CIBERTEC, Barcelona, España). Las señales recogidas se trataron con un soporte informático a través de un sistema de adquisición de datos acoplado al medidor de presión. Cada medición en cada animal se realizó 3-4 veces sucesivamente con el fin de calcular la media aritmética, que fue el valor utilizado.

4.2. TOMA Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

4.2.1. OBTENCIÓN Y TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE ORINA Y HECES.

La recolección de la orina y las heces se llevó a cabo colocando las ratas individualmente en jaulas de metabolismo, en ayuno y teniendo libre acceso a la bebida durante un periodo de 12 horas. Tras medir el volumen total, la orina se dividió en alícuotas y se conservaron a -80°C hasta el momento de su utilización. Las muestras de heces se pesaron, se sumergieron en N₂ líquido y se conservaron a -80°C para su posterior tratamiento.

4.2.2. OBTENCIÓN Y TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE LECHE.

Las muestras de leche se obtuvieron una vez anestesiadas las ratas madres, realizando masajes suaves y concéntricos a los pezones de las mamas y extrayendo por capilaridad la leche materna de las ratas, la cual se recogió en tubos de polipropileno conservándose a -80°C hasta su tratamiento y análisis.

4.2.3. OBTENCIÓN Y TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE SUERO.

Una vez anestesiados los animales, se procedió a extraer la sangre mediante punción intracardiaca a través del tórax. Enseguida, se dejó retraer el coágulo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 10 minutos y con una micropipeta se extrajo el suero, que se conservó a -80°C hasta ser utilizado para la determinación de los diversos parámetros.

4.2.4. OBTENCIÓN Y TRATAMIENTO DE LOS DISTINTOS ÓRGANOS.

Tras extraer el suero y después de realizar una laparotomía media, se procedió a la extracción de los órganos (hígado, riñón, corazón, páncreas y músculo), determinando su peso. Posteriormente, y sólo en el caso del hígado, se realizó un lavado con solución salina fisiológica fría (NaCl 0.9% p/v, 4°C; ACOFARMA) para eliminar el exceso de sangre. Todos los órganos se sumergieron en N₂ líquido y se conservaron a -80°C para su posterior análisis.

4.3. DETERMINACIÓN ANALÍTICA DEL SELENIO

La determinación de Se en las distintas muestras se llevó a cabo mediante un espectrofotómetro de absorción atómica (EAA) de alto rendimiento Perkin Elmer® (AANALYST 800) con software WinLab32. Este equipo cuenta con un horno de grafito con climatización transversal (THGA) y sistema de efecto Zeeman para corregir la señal así como con un inyector automático (Perkin Elmer, Überlingen, Alemania) y como fuente de radiación una lámpara de cátodo hueco especial de Selenio (ELDs).

Los parámetros instrumentales se determinaron teniendo en cuenta "Las técnicas Perkin Elmer y las condiciones recomendadas: Zeeman-THGA", y las condiciones para hornos de grafito utilizados por Grinberg y cols., (2005). Para la medición se utilizó una curva de calibración de Se (MERCK) a distintas concentraciones (5, 10, 25 y 50 µg/L) y modificadores de matriz de paladio y magnesio (MERCK).

Las muestras de suero se diluyeron cinco veces en 0.2% v/v HNO_3 y 0.2% de Triton X-100; en cambio, las muestras de orina no necesitaron tratamiento. El resto de muestras (hígado, corazón, riñón, páncreas, músculo, leche materna y heces) se desecaron en estufa durante 72 horas a 110°C y digirieron en un baño de arena (OVAN) durante 72 horas y ácido nítrico (HNO_3 al 65%, PANREAC) en una concentración de 1mL/ 0.1 g de tejido seco. Pasado este tiempo, se adicionó ácido perclórico (HClO_4 al 70%, PANREAC) en concentración 0.05 mL/ 0.1 g de tejido seco y se dejaron enfriar. Por fin, se añadió ácido clorhídrico (HCl 6N, PANREAC) en concentración 0.5 mL/10 mL de muestra y se procedió a la determinación de Se (Ojeda y cols., 2009a).

4.4. ESTUDIO DE ÍNDICES BIOLÓGICOS

Para determinar la absorción y el balance de Se aparente se emplearon los siguientes índices:

a) Coeficiente de Digestibilidad Aparente (C.D.A):

$$\text{C.D.A} = (A/I) \times 100$$
$$A = I - F$$

b) Balance Aparente (B):

$$B = I - (F + U)$$

Las siglas usadas son las indicadas por la FAO/OMS (1966): A = Se absorbido, I = Se ingerido, F = Se en la excreción fecal y U = Se en la excreción urinaria.

4.5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y LA OXIDACIÓN EN HÍGADO

4.5.1. HOMOGENIZACIÓN HEPÁTICA PARA DETERMINAR ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Para la determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes y la concentración total de proteínas, una parte del hígado congelado se pesó, se troceó y se sumergió en proporción 1:4 p/v en el tampón de sacarosa

(Sacarosa (ROIG FARMA) 250 mM; TRIS (SIGMA-ALDRICH), 15 mM; DTT (SIGMA), 1 mM; EDTA (SIGMA), 1 mM) utilizando un homogeneizador de tejidos con pistilo de teflón (Pobel 245432, España). El pH del tampón se ajustó con HCl (PANREAC; pH = 7, a 4°C).

Posteriormente, el homogeneizado obtenido se centrifugó a 3000 r.p.m. a 4°C durante 20 minutos. El sobrenadante obtenido se separó con una micropipeta y se dividió en alícuotas que posteriormente se congelaron a -80°C hasta el momento de los análisis.

4.5.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN TOTAL DE PROTEÍNAS

Para expresar la actividad de las enzimas antioxidantes como actividades específicas (U/mg de proteína) así como para poder cuantificar, posteriormente, las distintas proteínas por western blotting, determinamos las proteínas totales en el suero y en el homogeneizado de hígado.

Fundamento: La determinación de proteínas se lleva a cabo según el método descrito por Lowry (Lowry y cols. 1951). En este método se hacen reaccionar las proteínas con el reactivo Folin-Ciocalteu, lo que origina un complejo coloreado. El color se forma debido a la reacción del Cu^{2+} con las proteínas en medio alcalino, y por la reducción del fosfomolibdato por la tirosina y el triptófano presentes en las proteínas. La intensidad del color depende de la cantidad de estos aminoácidos aromáticos.

- a. Reactivo A: Na_2CO_3 2% (p/v) en NaOH 0,1 M.
- b. Reactivo B: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 1% (p/v).
- c. Reactivo C: Tartrato de sodio potasio 2.7% p/v.
- d. Reactivo D: 1.5 mL de reactivo B y 1.5 mL de reactivo C en 150 mL de reactivo A.
- e. Reactivo E: Reactivo de Folin-Ciocalteu diluido en agua bidestilada (1:1 v/v). Los reactivos D y E deben prepararse en el momento del uso.

Procedimiento: La técnica consiste en elaborar una curva patrón a partir de la cual, conociendo las concentraciones de los estándares y midiendo sus absorbancias, podemos calcular las concentraciones de las muestras por medio de la medición de absorbancia de cada muestra.

Para ello, se prepara una solución madre de albúmina bovina de concentración igual a 1 mg/mL, a partir de la cual se preparan cuatro soluciones estándares cuyas concentraciones son: P1: 0.1 mg/mL, P2: 0.05 mg/mL, P3: 0.025 mg/mL y P4: 0.0125 mg/mL.

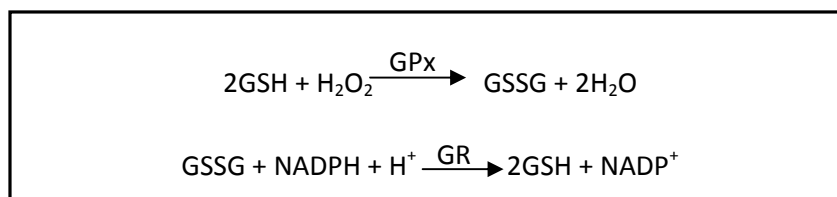
A continuación se mezclan en tubos de ensayo 5 mL de reactivo D con 1 mL de suero en el caso de las muestras (diluido con agua bidestilada 1/1000, para las enzimas antioxidantes) ó 1 mL de homogeneizado de hígado de ratas (diluido con agua bidestilada 1/500, para las enzimas antioxidantes y 1/300 para la determinación de la presencia de proteínas por western blotting), 1 mL de estándares en el caso de los patrones ó 1 ml de agua bidestilada en el caso del blanco, y se dejan reposar durante 15-20 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se añaden 0,5 mL de reactivo E a los tubos, se agitan y se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se procede a la lectura de las absorbancias frente al blanco en espectrofotómetro a una longitud de onda de 750 nm.

Cálculos: La concentración de proteínas totales en las muestras se calcula utilizando la curva patrón de albúmina de concentraciones conocidas. Tanto las muestras como la curva se analizan por duplicado.

4.5.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA GLUTATION PEROXIDASA

Fundamento: La enzima GPx cataliza la reducción de los peróxidos orgánicos y del H_2O_2) en una reacción en que interviene el glutatión. La actividad de esta enzima se determinó según el método descrito por Lawrence y Burk (1976) ligeramente modificado. En este método, el GSSG formado por la acción de la enzima GPx se acopla a la reacción que cataliza la glutatión reductasa,

midiendo la disminución de absorbancia a 340 nm como consecuencia de la oxidación del NADPH.



Los reactivos empleados en este método son: Tampón fosfato potásico (TPK) (pH = 7.4 a 4°C), 250 mM ; Solución EDTA (en tampón TPK) (SIGMA), 10 mM; Solución azida (NaN_3) (SIGMA), 10 mM; Solución NADPH (en NaHCO_3 al 0.75% p/v) (SIGMA), 2 mM; Solución GR (en tampón TPK) (SIGMA), 10 U; Solución peróxido de hidrógeno (FORET), 2.5 mM y Solución glutatión reducido (SIGMA), 10 mM.

Procedimiento: En una microcubeta de 1.5 mL de capacidad, se añaden 300 μL de TPK, 100 μL de EDTA, 100 μL de NaN_3 , 100 μL de NADPH, 100 μL de GSH, 100 μL de GR y 100 μL de suero diluido en agua bidestilada (dilución 1/10) en ratas o 100 μL de homogeneizado de hígado de ratas (dilución 1/40). Después de incubar las muestras durante 5 minutos a temperatura ambiente, se inicia la reacción con la adición de 100 μL de H_2O_2 y se determina la actividad GPx siguiendo espectrofotométricamente la disminución de la absorbancia a 340 nm durante 3 minutos. Las muestras problema se midieron frente al blanco, que se trató de la misma manera y que contenían agua bidestilada (200 μL) en lugar de H_2O_2 , para evitar el comienzo de la reacción.

Cálculos: La actividad de la enzima GPx se calcula según la fórmula:

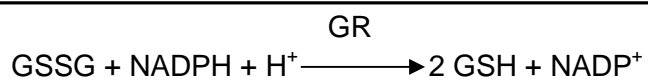
$$\text{mU/mg proteína} = [\Delta A(\text{min}) \cdot V_f \cdot 10^3 / v \cdot d \cdot V_m \cdot C] \cdot D$$

Donde: mU = nmol/minuto, A(min) = incremento de absorbancia de la muestra por minuto, valor absoluto, V_f = volumen final en mL en la microcubeta, d = coeficiente de absorción para el NADPH, cuyo valor es 6.22

$\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$, d = paso de luz de la cubeta, 1 cm, V_m = volumen de muestra (homogeneizado diluido) en mL en la cubeta, C = concentración de proteínas de la muestra (mg proteína/mL), D = dilución del homogeneizado.

4.5.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA GLUTATION REDUCTASA

Fundamento: La GR es una enzima dependiente de nicotinamín adenín fosfato reducido (NADPH), que cataliza la reducción del GSSG a GSH.



La determinación de la actividad GR se realizó según el método espectrofotométrico descrito por Worthington y Rosemeyer (1974) ligeramente modificado, donde se mide la disminución de absorbancia a 340 nm debida a la oxidación del NADPH.

Los reactivos utilizados fueron: Tampón fosfato potásico (TPK) (pH = 7.4 a 4°C), 0,066 M; Solución cloruro potásico (ACOFARMA), 2 M; Solución EDTA (en tampón TPK) (SIGMA), 10 mM; Solución glutatión oxidado GSSG (SIGMA), 10 mM y Solución NADPH (en NaHCO_3 al 0.1% p/v) (SIGMA), 1 mM.

Procedimiento: Para la determinación en suero, se mezclaron en una microcubeta: 540 μL (en el caso de las muestras de ratas) de tampón fosfato, 100 μL de KCl, 100 μL de EDTA, 100 μL de GSSG y 100 μL de NADPH. Tras 2 minutos de incubación a temperatura ambiente, la reacción se inició añadiendo 60 μL de suero puro, y se siguió la disminución de absorbancia a 340 nm durante 3 minutos. Todas las muestras problema se midieron frente al blanco, que se procesó de la misma forma aunque contenía tampón TPK en lugar del suero.

Para la determinación en homogeneizado de hígado de ratas, se añadieron en una microcubeta: 590 μL de tampón fosfato, 100 μL de KCl, 100 μL de EDTA, 100 μL de GSSG y 100 μL de NADPH. Después de 2 minutos de incubación a temperatura ambiente, la reacción se inició adicionando 10 μL de homogeneizado puro, y se aguardó la disminución de absorbancia a 340 nm durante 3 minutos. Todas las muestras problema se midieron frente al blanco, que se preparó de la misma manera aunque contenía TPK en lugar del homogeneizado.

Cálculos: La actividad de la enzima glutatión reductasa se obtiene por medio del siguiente cálculo:

$$\text{mU/mg} = [\Delta A(\text{min}) \cdot V_f \cdot 10^3 / v \cdot d \cdot V_m \cdot C]$$

Donde: mU = nmol/minuto, $A(\text{min})$ = incremento de absorbancia de la muestra por minuto, valor absoluto, V_f = volumen final en mL en la microcubeta, ϵ = coeficiente de absorción para el NADPH, cuyo valor es $6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, d = paso de luz de la cubeta, 1 cm, V_m = volumen de muestra (homogeneizado) en mL en la cubeta, C = concentración de proteínas de la muestra (mg proteína/mL).

4.5.5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD SUPERÓXIDO DISMUTASA

Fundamento: La enzima SOD está encargada de la formación de H_2O_2 y O_2 a partir del O_2^- .



La actividad SOD se ensaya siguiendo el método descrito por Fridovich (1985), parcialmente modificado, en el que se utiliza el sistema xantina/xantina oxidasa para generar radicales superóxido (O_2^-).

El radical superóxido es capaz de reducir el citocromo c y esta reducción es inhibida por la enzima SOD, que compite por los radicales superóxidos y los “secuestra” llevando a cabo su dismutación. Por ello, según este método, el grado de inhibición en la reacción de reducción del citocromo c es un indicador de la actividad de la superóxido dismutasa.

Los reactivos utilizados fueron: Tampón fosfato potásico (TPK) K_2HPO_4 / KH_2PO_4 (pH = 7.8 a 4°C) c/DTPA, 0,066 M; Solución xantina (SIGMA), 0.5 mM; Solución citocromo c (SIGMA), 100 μ M; Solución cianuro sódico (NaCN) (PANREAC), 0.5 mM; Solución catalasa (SIGMA), 10 U y Solución xantina oxidasa (SIGMA), 25 U.

Procedimiento: En una microcubeta se depositaron todos los reactivos necesarios para llevar a cabo la reacción, excepto la xantina oxidasa: 490 μ L de TPK, 200 μ L de xantina, 200 μ L de citocromo c, 100 μ L de NaCN, 100 μ L de catalasa y 10 μ L de muestra (suero/hígado). A continuación, se inició la reacción adicionando 10 μ L de xantina oxidasa, y se observó el aumento de absorbancia a 550 nm durante 3 minutos, debido a la reducción del citocromo c.

Para medir la reducción neta del citocromo c (es decir, en ausencia de SOD), se realizó una medida de referencia que se procesó de la misma forma pero no contenía muestra, de forma que se produjo la reducción del citocromo c debida a la acción de los radicales superóxidos formados por el sistema xantina/xantina oxidasa.

En las muestras, como se ha explicado anteriormente, la SOD compite con el citocromo c por los radicales superóxido, de forma que hubo una inhibición de la reducción del mismo. Se definió una unidad (U) de SOD como la cantidad de enzima que produjo la inhibición de un 50 % de la reducción del citocromo c.

Las muestras problema se midieron frente a su blanco de muestra, que se procesó de la misma forma pero la reacción no se inició con la adición de xantina oxidasa.

Cálculos: Los resultados se expresan en U/mg proteína y se calculan según las siguientes expresiones:

$$\begin{aligned} \% \text{ inhibición} &= 100 - [(A_{\text{muestra/min}} \cdot 100) / A_{\text{referencia/min}}] \\ \text{U/mg proteína} &= \% \text{ inhibición} / (50 \cdot c) \end{aligned}$$

Donde: A = incremento de absorbancia y c = mg de proteína presente en la muestra.

4.5.6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CATALASA

Fundamento: La CAT es una enzima altamente activa que cataliza la reducción del H_2O_2 a agua.



Su determinación se llevó a cabo por el método descrito por Beers y Sizer (1952), en el cual la disminución de absorbancia debida a la desaparición de H_2O_2 es medida espectrofotométricamente a 240 nm.

Los reactivos utilizados fueron: Tampón fosfato potásico (TPK) (pH= 7.4 a 4°C), 0.066 M y Solución H_2O_2 (FORET), 1/100 v/v.

Procedimiento: En una cubeta macro de cuarzo con un paso de luz de 1 cm, se añadió 2 mL de TPK y 120 μL de muestra (homogeneizado de hígado diluido en agua bidestilada 1/120). Posteriormente, se inició la reacción añadiendo 480 μL de H_2O_2 y se midió la disminución de absorbancia, debida a la reducción del peróxido de hidrógeno, a 240 nm durante 3 minutos. La medida se realizó frente al aire.

Cálculos: La actividad de la enzima presente en la muestra se calcula según la fórmula:

$$\text{mU/mg proteína} = [\Delta A(\text{min}) \cdot V_f / v \cdot d \cdot V_m \cdot C] \cdot D$$

Donde: U = $\mu\text{mol/minuto}$, A(min) = incremento de absorbancia de la muestra por minuto, valor absoluto, V_f = volumen final en mL en la cubeta, ϵ = coeficiente de extinción molar de H_2O_2 ($= 0.0394 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), d = paso de luz de la cubeta, 1 cm, V_m = volumen de muestra en la cubeta en mL, C = concentración de proteínas de la muestra (mg proteína/mL), D = dilución de homogeneizado.

4.5.7. DETERMINACIÓN DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

Fundamento: Uno de los métodos más utilizados para evaluar la peroxidación lipídica es la cuantificación de malondialdehído (MDA) por medio de su reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBA). El MDA es un producto final de la degradación oxidativa de los lípidos que, en condiciones de bajo pH y temperatura elevada, participa fácilmente en una reacción de adición nucleófila con el TBA, generando un pigmento rojo fluorescente (compuesto por una molécula de MDA y dos de TBA) que puede ser determinado por espectrofotometría.

Para la determinación del MDA seguimos el método descrito por Draper y Hadley (1990), en el cual se valora espectrofotométricamente a 535 nm el aducto de color rojo formado al reaccionar el MDA con el TBA.

Los reactivos usados para la determinación de la peroxidación lipídica fueron: Solución ácido tricloroacético (TCA) (MERCK), 20% p/v y Solución ácido tiobarbitúrico (TBA) (SIGMA) al 0.67% p/v.

Procedimiento: En el interior de tubos eppendorf con tapón de seguridad, una alícuota de 150 μL de suero o homogeneizado de hígado se mezcló con un volumen igual de ácido tricloroacético (TCA) y se centrifugó durante 10 minutos

a 14000 r.p.m. y 4°C para precipitar las proteínas. Del sobrenadante que resultó, se tomó una alícuota (150 µl) y se añadió una parte igual de TBA al 0,67%, incubando la mezcla en un baño de agua hirviendo (100°C) durante 10 minutos. Pasado este tiempo, se bajó la temperatura introduciendo los tubos en hielo y se midió la absorbancia de la muestra frente al blanco a 535 nm. El blanco se procesó igual que una muestra pero contenía una alícuota de agua bidestilada en lugar de suero.

Cálculos: La concentración de MDA presente en las muestras se calculó a través de la expresión:

$$A = \epsilon \cdot C \cdot d$$

Donde: A = absorbancia de la muestra, ϵ = coeficiente de extinción molar para el MDA a 535 nm ($\epsilon = 153 \cdot 10^3$ ml/mol.cm), C = concentración de MDA en la muestra (mol/mL), d = paso de luz de la cubeta (1 cm).

Los resultados se expresaron en moles de MDA formados/mg proteína en los 10 minutos de incubación.

4.5.8. DETERMINACIÓN DE LA OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS

Fundamento: La oxidación de proteínas provoca un aumento de los grupos carbonilos en éstas. La 2,4-dinitrofenilhidrazina se une a estos grupos para formar 2,4-dinitrofenilhidrazona, un complejo coloreado que absorbe a una longitud de onda de 366 nm (Reznick y Packer, 1994).

Los reactivos utilizados para esta determinación fueron: Tampón fosfato potásico (TPK) (pH= 7.0 a 4°C), 10 mM; Solución dodecil sulfato de sodio (SDS) (SIGMA), 24% p/v; Solución de dinitrofenilhidrazina (DNPH) (en HCl) (ACOFARMA), 10 mM; Solución TCA (MERCK), 20% p/v; Solución de etanol/acetato de etilo, 1/1 v/v y Solución guanidina en ácido fórmico (diluido en agua bidestilada 1/1 v/v), 6 M.

Procedimiento: A partir del suero o del homogeneizado de hígado se prepararon 300 μL de muestra que contenían aproximadamente una concentración de 5 mg proteína/mL. Para ello, una alícuota de suero u homogeneizado (125 μL) se mezcló con un volumen igual de SDS al 24% para solubilizar las proteínas, y se completó con TPK hasta alcanzar el volumen final deseado.

La muestra se incubó durante 3 minutos en baño de agua a 100°C y, posteriormente, se enfrió en hielo. A continuación, a los 300 μL de muestra se le añadieron 300 μL de DNPH y la mezcla se incubó a temperatura ambiente (25°C) durante 1 hora, agitando cada 15 minutos. Pasado este tiempo, se añadió 300 μL de TCA y se centrifugó la mezcla 3 minutos a 11000 g y 4°C. Tras desechar el sobrenadante, el precipitado obtenido se lavó tres veces con 1 mL de la solución de etanol/acetato de etilo, centrifugando (3 minutos, 11000 g, 4°C) después de cada lavado y desechando el sobrenadante tras la centrifugación. Por último, el precipitado final se resuspendió en 600 μL de guanidina 6 M y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante toda la noche. Al día siguiente, la muestra se centrifugó a 11000 g, 4°C durante 3 minutos y se midió la absorbancia del sobrenadante frente al blanco (solución de guanidina) a 366 nm.

Cálculos: La concentración de los grupos carbonilos presente en la muestra se calculó a través de la expresión:

$$A = \epsilon \cdot C \cdot d$$

Donde: A = absorbancia de la muestra, ϵ = coeficiente de extinción molar para la 2,4-dinitrofenilhidrazona ($\epsilon = 21000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), C = concentración de grupos carbonilos en la muestra (mol/L), d = paso de luz de la cubeta (1 cm).

Los resultados se expresaron en nmoles de grupos carbonilos formados/mg proteína.

4.6. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS HEPÁTICAS

4.6.1. HOMOGENIZACIÓN HEPÁTICA PARA WESTERN BLOTTING

El hígado se homogeneizó en tampón fosfato preparado en una dilución 1:10 p/v con los siguientes reactivos: K_2HPO_4 (PANREAC), 50mM; KH_2PO_4 (PANREAC), 50mM y EDTA (SIGMA), 0.01mM.

Previamente, un inhibidor de proteasas (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, ROCHE) fue añadido al tampón fosfato en la proporción 1/10. Para la determinación del AMPK fosforilado se utilizó también un inhibidor de fosfatasas (Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets, ROCHE) en la misma proporción.

Por último, el homogeneizado obtenido se centrifugó a 2000 g. durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante final se dividió en alícuotas y se congeló a -80°C hasta llevar a cabo la determinación de proteínas totales y la inmunodetección de proteínas.

4.6.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS ANTICUERPOS

Los niveles de expresión de las selenoproteínas GPx-1, GPx-4 y selenoproteína P (SelP), así como del AMPK (total y fosforilado) y del IRS-1 fueron determinados por medio de la técnica de inmunodetección de proteínas o Western Blotting por el método de Laemmli (1970), que se utiliza para identificar y localizar proteínas en base a su capacidad para unirse a anticuerpos específicos, además de proporcionar información acerca del tamaño de la proteína de interés mediante la transferencia de macromoléculas biológicas desde un gel hasta una membrana y su posterior detección en la superficie de la misma.

Este proceso es necesario ya que todas estas macromoléculas están embebidas dentro de la matriz que forma el gel, lo que imposibilita realizar su detección, mientras que en la membrana, se encuentran accesibles al estar adheridas sobre la superficie de la misma.

En la Tabla 4.6.3.1 se encuentran las características de los anticuerpos y las diluciones usadas en cada determinación.

4.6.3. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA CON SDS: SDS-PAGE

Fundamento: La separación de las proteínas según su masa molecular se efectuó por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida. Los geles de poliacrilamida se obtienen por la polimerización de moléculas de acrilamida y N,N'-metilén-bisacrilamida, disueltas en un tampón adecuado. Para ello, requieren la acción de un polimerizador como el persulfato amónico (APS), que al disolverse en agua induce la formación de diversos radicales libres en la acrilamida, favoreciendo de esta manera su polimerización.

Tabla 4.6.3.1 Características de los anticuerpos usados

Anticuerpo	Clasificación y peso molecular	Dilución	Variante	Referencia comercial
GPx 1	Primario (23 kDa)	1:10000	IgG policlonal en conejo	(SC-30147) SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY
GPx 4	Primario (21 kDa)	1:5000	IgG policlonal en conejo	(SC-50497) SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY
SelP	Primario (57 kDa)	1:20000	IgG policlonal en conejo	(SC-30162) SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY
AMPK $\frac{1}{2}$	Primario (63 kDa)	1:4000	IgG policlonal en conejo	(SC-25792) SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY
p-AMPK $\frac{1}{2}$ (Thr-172)	Primario (63 kDa)	1:4000	IgG policlonal en conejo	(SC-33524) SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY
IRS-1	Primario (170kDa)	1:1000	IgG policlonal en conejo	(SC-7200) SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY
Anti-rabbit IgG	Secundario	GPx1- 1:5000 GPx4- 1:10000 Sel P- 1:20000 AMPK-1:10000 IRS-1-1:2000	Anti-IgG en conejo	(SC-2030) SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY
Anti- -Actina (Mouse IgG1)	Primario (42 kDa)	1:20000	IgG1 monoclonal en ratón	(A5441) SIGMA
Anti-Mouse IgG1	Secundario	1:8000	Anti-IgG1 monoclonal en ratón	(A9044) SIGMA

La gelificación se consigue mediante la formación de enlaces cruzados en presencia de la bisacrilamida. Así se obtiene una malla de cadenas de poliacrilamida. A este proceso de polimerización también se añade un estabilizador de los radicales libres, el tetrametilén diamina (TEMED).

La separación de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) se realiza en función de su carga y de su forma, dependiendo esta última del plegamiento de la proteína.

Los detergentes desnaturalizan las proteínas, rompiendo el plegamiento y consiguen que todas las proteínas presenten la misma forma y también una densidad de carga muy similar. El dodecil sulfato de sodio (SDS) es un detergente que se une en una proporción de aproximadamente 1.4 g de SDS por 1 g de proteína, lo que proporciona una relación carga/masa muy uniforme para la mayor parte de las proteínas. El tratamiento simultáneo con un agente reductor de puentes disulfuro, como el 2-mercaptoetanol, asegura que la proteína está completamente desnaturalizada antes de ser cargada en el gel, garantizando que corre de manera uniforme.

Para controlar visualmente el avance de la proteína en la electroforesis y evitar que sobrepase el extremo del gel, se emplea un colorante como el azul de bromofenol.

Procedimiento: Previamente a la carga de las muestras, en un tubo de eppendorf de 1.5 mL se pipeteó el volumen necesario de muestra para la cantidad de proteína que queríamos cargar (100 µg) y se llevó hasta el volumen deseado con tampón de carga, con el objetivo de pipetear el mismo volumen y la misma cantidad para todas las muestras. A continuación, se incubaron las muestras a 95°C durante 5 minutos, para desnaturalizar las proteínas.

A continuación se prepararon los geles con la composición establecida en la tabla 4.6.3.2.

El gel separador, se vertió entre los dos vidrios de un equipo de BIO-RAD LABORATORIES para Western Blotting. Para que la superficie del gel quedase plana y se evitase la entrada de oxígeno atmosférico, se añadió agua

bidestilada entre los vidrios. Cuando el gel polimerizó (aproximadamente en 25-30 minutos), se eliminó el agua bidestilada, se vertió el gel concentrador y se introdujo un peine evitando la formación de burbujas. Este último se retiró con cuidado tras la polimerización del gel (después de 30 minutos). A continuación se montó el equipo de electroforesis y se llenó la cubeta con tampón de electroforesis diluido (1/10) en agua bidestilada, se cargaron las muestras en los pocillos, así como el marcador de peso molecular (Prestained Protein Molecular Weight Marker 26612- THERMO SCIENTIFIC) con ayuda de una pipeta y se conectó la cubeta a una fuente de voltaje. Se aplicó una intensidad de 150 V con un regulador de voltaje (PowerPacTM Basic – BIO-RAD), hasta que el frente de las muestras alcanzó el extremo final del gel.

La composición de los tampones fue:

1. Tampón de carga: Tris (SIGMA) a pH 6.8 en concentración 1M; Glicerol (PANREAC), 0.1 % p/v; Dodecil sulfato de sodio (SDS) (SIGMA), 10% p/v; Azul de Bromofenol (SIGMA), 2 % v/v y 2-mercaptoetanol (BIO-RAD) al 5 % v/v.
2. Tampón de electroforesis: Tris (SIGMA), 250 mM; Glicina (SIGMA), 1.92 M y Dodecil sulfato de sodio (SDS) (SIGMA), 1% p/v.

Tabla 4.6.3.2 Componentes empleados en los geles

Reactivo	Cantidades		
	Gel separador para la GPx1 y GPX-4 (12% acrilamida)	Gel separador para selenoproteína P (8% acrilamida)	Gel concentrador
Agua bidestilada	3,3 mL	4,6 mL	5,5 mL
Acrilamida-bisacrilamida 30% (BIO-RAD)	4 mL	2,7 mL	1,3 mL
Tris (SIGMA) 1.5 M a pH 8,8	2,5 mL	2,5 mL	1 mL
Dodecil sulfato de sodio (SDS) (SIGMA) al 10% p/v en agua bidestilada	100 µL	100 µL	80 µL
Persulfato amónico (APS) (SIGMA) al 10% p/v en agua destilada	100 µL	100 µL	80 µL
TEMED (BIO-RAD)	5 µL	6 µL	8 µL

4.6.4. TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS

Fundamento: Esta técnica permite que las proteínas separadas por electroforesis sean accesibles a la detección por anticuerpos, dado que las proteínas se quedan fuertemente adheridas a la superficie de una membrana, generalmente de nitrocelulosa.

Los reactivos usados para la preparación del tampón de transferencia fueron: Tris (SIGMA), 20 mM; Glicina (SIGMA), 192 mM y Metanol (PANREAC), 20 %v/v.

Procedimiento: Se recortó un rectángulo de membrana de nitrocelulosa (BIO-RAD) y dos de papel de Whatman, ambos ligeramente mayores que el gel, y se sumergieron en tampón de transferencia, en simultáneo con dos almohadillas de esponja. Se realizó el montaje de transferencia en un cassette adecuado para el efecto, siguiendo el orden: tapa negra, almohadilla de esponja, papel de Whatman, gel, membrana, papel de Whatman, almohadilla de esponja y tapa transparente. Al mismo tiempo se aplicó presión para evitar la formación de burbujas entre el gel y la membrana. Este cassette se colocó en la cubeta de transferencia, conjuntamente con una barra magnética y una bolsa de hielo y se llenó la cubeta con tampón de transferencia hasta el nivel indicado. Por último, se conectó a una fuente de voltaje y se aplicó una intensidad de 100 V durante una hora.

4.6.5. INMUNODETECCIÓN

Fundamento: La inmunodetección puede ser indirecta o directa. La inmunodetección indirecta se basa en un procedimiento en el cual se emplea un anticuerpo específico para localizar la proteína que quiere estudiarse (anticuerpo primario) y un segundo anticuerpo (anticuerpo secundario) contra las inmunoglobulinas de la especie en la que se ha obtenido el anticuerpo primario. El anticuerpo secundario posee alguna marca capaz de producir una señal detectable. Este es el método más comúnmente empleado y también lo que se utilizó en nuestro estudio.

Los reactivos utilizados fueron:

3. Solución TBST: Tris (SIGMA), 10 mM; NaCl (ACOFARMA), 100 mM y Tween 20 (SIGMA), 0.1% v/v.
4. Solución de bloqueo y de dilución de anticuerpos (BIO-RAD), 3% p/v disuelta en TBST.
5. Solución de Ponceau S en 5% de ácido acético (SIGMA), 0.1 %p/v.

Procedimiento: Una vez efectuada la transferencia se comprobó la eficacia de la misma. Para ello, en un recipiente plástico se tiñó la membrana con el colorante de Ponceau, durante breves instantes, y seguidamente se lavó cuidadosamente con agua bidestilada. Tras este paso, se introdujo la membrana en una solución de bloqueo, de forma que quedase completamente cubierta y se dejó incubando a temperatura ambiente durante una hora en agitación orbital a 50 r.p.m. (aparato Orbit 1000-LABNET).

Finalizado el bloqueo de la membrana, ésta se incubó con el anticuerpo primario específico diluido en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C en el agitador orbital (Tabla 4.6.3.1). Terminada la incubación, se realizaron ocho lavados con TBST de tres minutos cada uno. El anticuerpo secundario se preparó de la misma forma que el primario con las diluciones específicas detalladas anteriormente (Tabla 4.6.3.1). Este se dejó incubando una hora a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se procedió a lavar de la misma forma que con el anticuerpo primario.

4.6.6. REVELADO

Fundamento: En nuestro experimento se utilizó el proceso de quimioluminiscencia. Este se basa en la emisión de energía en forma de luz a partir de una sustancia, como consecuencia de una reacción química. Para este efecto es común la utilización de un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa de rábano, actuando esta como catalizadora de la reacción.

Los materiales empleados en esta fase son: Cassette de exposición, Películas de alta sensibilidad (KODAK), Revelador y Fijador (KODAK) y Detector de quimioluminiscencia (ADVANSTA - WesternBright™ Quantum).

Procedimiento: En una habitación oscura, la membrana se incubó durante dos minutos con el líquido detector de quimioluminiscencia. Seguidamente se retiró el exceso de detector y se colocó la membrana en el interior del cassette y se expuso frente a la película fotográfica, durante breves minutos. Por último, se introdujo la película en recipientes que contenían la solución reveladora, el agua y la solución fijadora y se dejó secar a temperatura ambiente.

Los resultados obtenidos se analizaron por densitometría y se cuantificaron en términos de densidad óptica, siendo expresados como porcentaje de unidades relativas tomando como 100% los datos del grupo control. Para este fin, se utilizó el programa analítico PCBAS 2.08e.

El anticuerpo de la β -actina se utilizó como control de expresión de cada una de las proteínas investigadas.

4.7. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE DATOS

Los resultados se expresan como la media \pm error estándar medio (ESM). Las medias mostradas se obtuvieron a partir de al menos 8 datos. Los datos se analizaron utilizando el programa estadístico GraphPad InStat 3, para el análisis de varianza ANOVA (one-way). Posteriormente, se utilizó el test de Tukey-Kramer para determinar las diferencias significativas entre las medias de los valores obtenidos para los dos grupos estudiados. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas para valores de $p < 0,05$.

Para expresar las diferencias estadísticamente significativas entre los diversos grupos experimentales en ratas se utilizó la siguiente simbología:

Tabla 4.7.1 Significación utilizada.

Grupos	p<0,05	p<0,01	p<0,001
C vs F	*	**	***
CH vs FH			
CM vs FM			
CH vs CM			
FH vs FM			

Siendo C el grupo control, F el grupo alimentado con fructosa, CH hembras control, FH hembras del grupo alimentado con fructosa, CM machos control y FM machos del grupo alimentado con fructosa.

4.8. ESQUEMA RESUMEN DE MATERIAL Y MÉTODOS

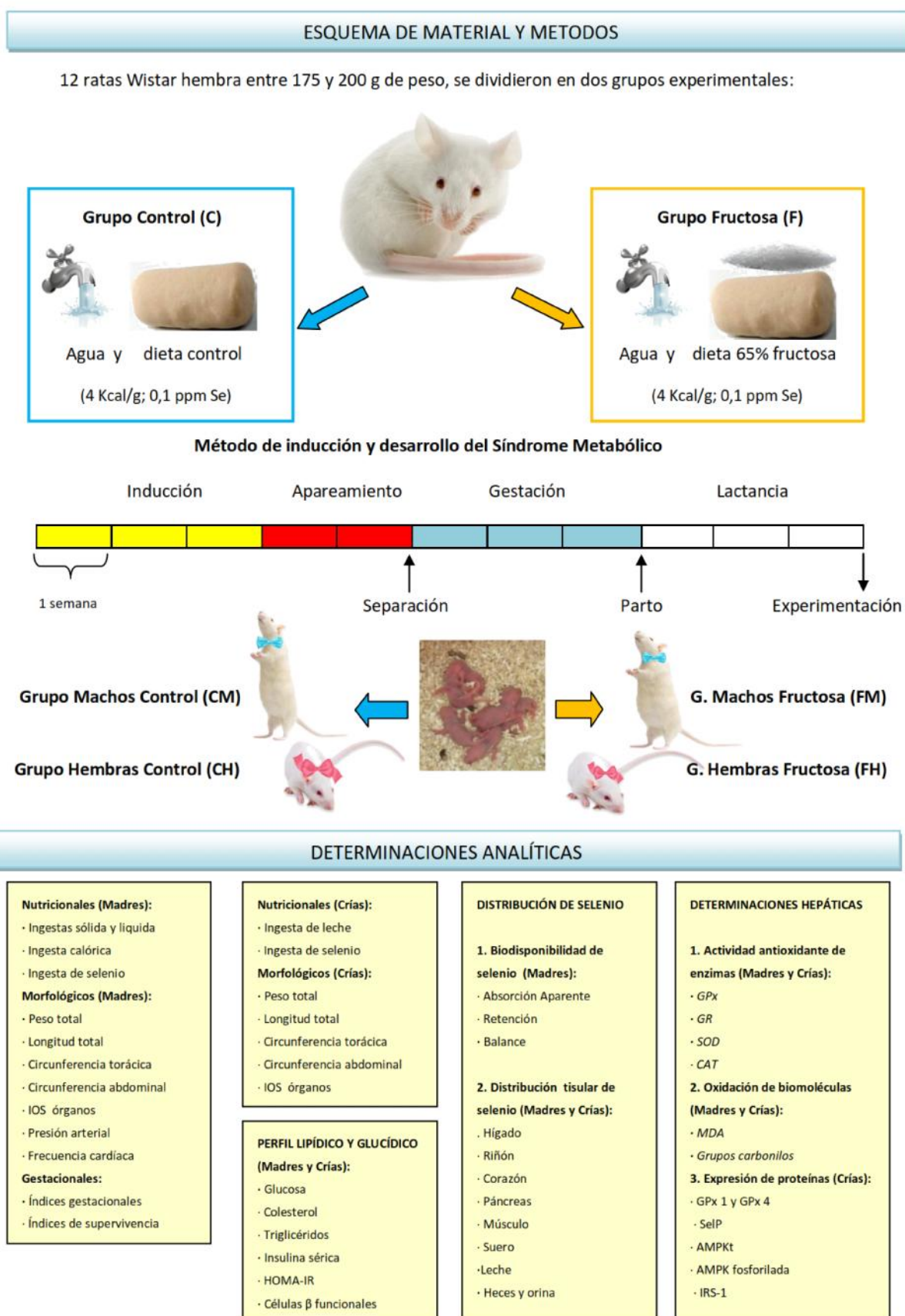


Figura 4.8. Resumen del apartado Material y Métodos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se ha argumentado en los antecedentes con los estudios de Johnson y cols., (2007) y Dekker y cols. (2010), el SM muestra unos síntomas y signos muy característicos sobre algunos parámetros como el IMC, que está elevado, una mayor presencia de grasa abdominal, HTA, hiperglucemia, hipertriglicemia e hiperinsulinemia. Utilizaremos algunos de estos parámetros, obtenidos de la experimentación para confirmar el SM en las madres del grupo F, y sobre todo, para realizar un análisis sobre el efecto del mismo en las crías.

5.1. ANÁLISIS NUTRICIONAL, MORFOLÓGICO Y METABÓLICO EN MADRES LACTANTES

5.1.1. CONTROL NUTRICIONAL

Como se observa en la Tabla 5.1.1, durante la gestación, el consumo excesivo de fructosa no altera las ingestas diarias sólida y líquida. Sin embargo, durante la lactancia las madres del grupo fructosa ingirieron significativamente menor cantidad de alimento, y por tanto menos Kcal diarias que las controles ($p < 0,05$), no encontrándose diferencias significativas en la ingesta de agua.

Estos datos concuerdan con los resultados de Zou y cols. (2012), que utilizaron también una dieta rica en fructosa (63%) en ratas no preñadas, gestantes y lactantes, confirmando que sólo durante la lactancia las ratas que ingieren fructosa comen menos y consecuentemente pierden peso.

Tabla 5.1.1. Control nutricional de las madres

		Control	Fructosa
Ingesta sólida (g/día)	Gestación	18,51 \pm 0,42	18,30 \pm 1,09
	Lactancia	44,93 \pm 2,97	35,47 \pm 2,07*
Ingesta calórica (kcal/día)	Gestación	74,06 \pm 1,71	73,19 \pm 4,35
	Lactancia	179,74 \pm 11,86	145,72 \pm 9,32*
Ingesta agua (mL/día)	Gestación	25,14 \pm 0,97	26,68 \pm 1,94
	Lactancia	52,29 \pm 7,38	43,32 \pm 4,87

Los resultados son expresados como la media \pm ESM. N° de animales= 6. Control vs Fructosa * $p < 0,05$.

5.1.2. VALORACIÓN MORFOLÓGICA

En la Tabla 5.1.2.1 se observa una disminución significativa del incremento de peso en el grupo de madres fructosa frente a los controles al final de la lactancia ($p < 0,05$). Este hecho está relacionado con la menor ingesta sólida y calórica que presentan las madres del grupo fructosa durante la lactancia (Tabla 5.1.1). Como se ha comentado anteriormente, Zou y cols. (2012) encontraron datos similares.

Tabla 5.1.2.1. Estado nutricional de las madres

	Control	Fructosa
Peso inicial (g)	194,10 \pm 6,08	190,85 \pm 5,69
Peso final (g)	227,60 \pm 5,77	215,7 \pm 4,17
Incremento peso global (g)	33,10 \pm 1,7	24,75 \pm 2,12*

Los resultados son expresados como la media \pm ESM. N° de animales=6. Control vs Fructosa * $p < 0,05$.

La Figura 5.1.2 muestra que las madres del grupo fructosa al final de la lactancia presentan un IMC menor que los controles ($p < 0,05$), en parte previsible por la menor ingesta calórica presentada. Sin embargo este menor IMC se refleja en una menor circunferencia torácica ($p < 0,05$), y no en una menor circunferencia abdominal, manteniéndose un perfil corporal concordante con la aparición de un SM (Dekker y cols., 2010).

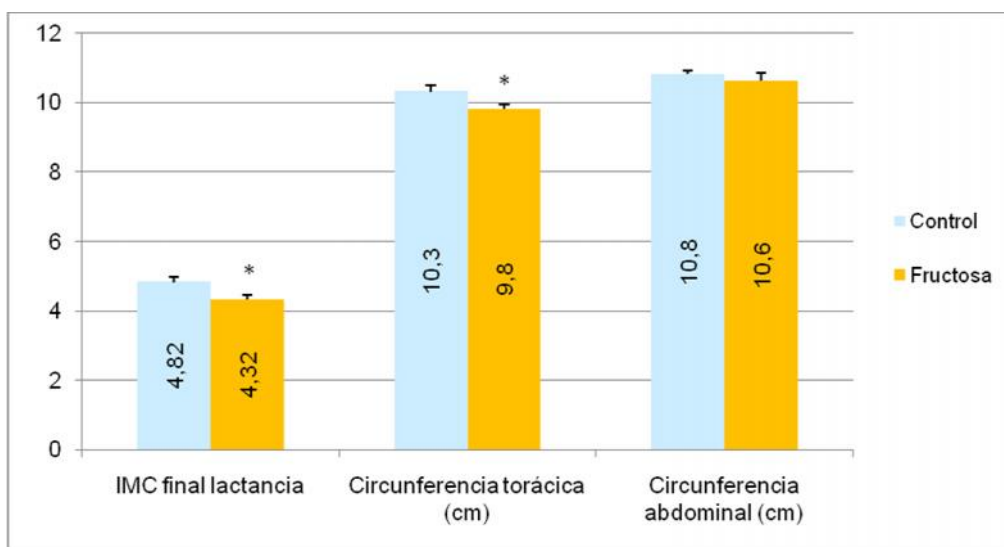


Figura 5.1.2. Parámetros morfológicos de madres al final de la lactancia: IMC (Kg/m^2) y circunferencias torácica y abdominal (cm). Los resultados son expresados como la media \pm ESM. N° de animales=6. Control vs Fructosa * $p < 0,05$.

Al analizar macroscópicamente los diferentes órganos maternos al final de la lactancia, se observa en la Tabla 5.1.2.2, que el IOS del hígado es significativamente mayor en las madres del grupo fructosa que en las controles ($p < 0,05$). No hay diferencias sin embargo, en el resto de órganos.

Tabla 5.1.2.2. Índice organosomático (IOS) en madres al final de la lactancia (%)

	Control	Fructosa
Hígado	7,017 \pm 0,195	8,079 \pm 0,315*
Corazón	0,355 \pm 0,017	0,316 \pm 0,015
Páncreas	1,116 \pm 0,031	0,850 \pm 0,107
Riñón	0,928 \pm 0,028	0,938 \pm 0,031
Músculo	0,540 \pm 0,020	0,560 \pm 0,016

Los resultados son expresados como la media \pm ESM. N° de animales=6. Control vs Fructosa * $p < 0,05$.

Este aumento del IOS hepático confirma la existencia de SM, según los resultados de los estudios de Zou y cols., (2012), Mukai y cols., (2012) y Kitagawa y cols., (2012), quienes comprueban que el peso de los hígados de ratas alimentadas con una dieta rica en fructosa es mayor y presentan esteatosis hepática junto con unos elevados valores de TG en hígado. Este aumento relativo del peso hepático se debe, en parte, a que la fructosa estimula rápida y claramente la lipogénesis de novo causando esteatosis hepática, estrechamente vinculada a la RI. Además, algunas investigaciones sugieren que la fructosa puede provocar inflamación hepática y estimular el desarrollo de la fibrosis hepática. Esto plantea la posibilidad de que la fructosa favorezca la aparición del hígado graso no alcohólico (Tappy y Lê, 2012).

Junto a esta acción de la fructosa, hay que destacar que la actividad de la ácido graso sintetasa, enzima clave en la síntesis de ácidos grasos, está fisiológicamente aumentada (cerca de 1/50) durante la lactancia (Zou y cols., 2012). Todo ello, sugiere que los efectos de la fructosa sobre el perfil lipídico hepático, factor crítico en el desarrollo del SM (Kotronen y cols., 2007), están especialmente amplificados durante la lactancia.

5.1.3. ANÁLISIS DEL METABOLISMO LIPÍDICO Y GLUCÍDICO

Respecto al perfil lipídico y glucídico, cuya alteración acompaña al SM, la Tabla 5.1.3 muestra que los TG están significativamente aumentados en el grupo de madres fructosa ($p<0,05$), no así el colesterol y la glucemia. Este aumento de TG en sangre puede ser un reflejo del aumento de su síntesis hepática como demuestra Zou y cols., (2012).

Por otro lado, la medición de la insulina sérica en el grupo de madres fructosa está muy disminuida frente a las controles ($p<0,01$). Consecuentemente, el índice HOMA-IR y el porcentaje de células funcionales son numéricamente inferiores en las madres fructosa que en las controles ($p<0,001$). Estos datos coinciden con los resultados de Zou y cols., (2012) que también observaron que tras una sobrecarga de glucosa aparece una hiperglucemia significativa a los 10 y 20 minutos, así como un aumento en el área total bajo la curva de la glucosa. Estos autores defienden que los efectos de una dieta rica en fructosa durante la gestación y la lactancia afectan al metabolismo glucídico de modo específico.

Tabla 5.1.3. Perfil lipídico y glucídico en madres al final de la lactancia

	Control	Fructosa
Triglicéridos (mg/dL)	109,00± 6,86	154,71 ± 12,85*
Colesterol (mg/dL)	150,00 ± 9,5	162,50 ± 2,87
Glucosa (mg/dL)	214,83 ± 6,37	221,83 ± 5,97
Insulina sérica (mUI/L)	0,223 ± 0,021	0,134 ± 0,012**
Índice HOMA-IR	0,117 ± 0,006	0,075 ± 0,005***
Células β funcionales (%)	0,545 ± 0,053	0,303 ± 0,020**

Los resultados son expresados como la media \pm ESM. N° de animales=6. Control vs Fructosa

* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

5.1.4. PRESIÓN ARTERIAL Y FRECUENCIA CARDÍACA

Como se observa en la Tabla 5.1.4, la presión arterial sistólica en las madres del grupo fructosa al final de la lactancia es significativamente mayor que en las controles ($p<0,05$). Asimismo, la presión diastólica y la presión media, se encuentran muy aumentadas en el grupo fructosa ($p<0,01$). Estos aumentos en los valores de presión arterial están relacionados con el desarrollo

del SM. Sin embargo, la frecuencia cardíaca en el grupo fructosa es significativamente menor que en el grupo control ($p < 0,05$).

Tabla 5.1.4. Presión arterial y frecuencia cardíaca de madres al final de la lactancia.

		Control	Fructosa
Presión arterial final lactancia (mmHg)	Sistólica	137,03 \pm 2,75	145,78 \pm 2,58*
	Diastólica	91,97 \pm 2,88	102,08 \pm 1,54**
	Pulso	46,28 \pm 3,73	44,74 \pm 3,25
	Media	109,18 \pm 1,82	121,85 \pm 2,47**
Frecuencia cardíaca (latido/min)		383,6 \pm 6,00	361,2 \pm 6,57*

Los resultados son expresados como la media \pm ESM. N° de animales=6. Control vs Fructosa

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Estos resultados coinciden con Abdulla y cols., (2011, 2012, 2013) que confirmaron la aparición de HTA tras la ingesta de una dieta rica en fructosa. Estos autores defienden que la ingesta de fructosa actúa mediante diferentes mecanismos, tales como producción de dislipemia, EO, aumento de ácido úrico, y especialmente activación del sistema Renina-Angiotensina y el sistema nervioso simpático (SNS), que solos o en conjunto, terminan produciendo una vasoconstricción que incrementa la resistencia periférica y aumenta la presión arterial. Esta explicación concuerda con los resultados encontrados, pues teniendo en cuenta que la presión arterial depende de la resistencia periférica y el gasto cardíaco, las ratas fructosas disminuyen la frecuencia cardíaca, disminuyendo el gasto cardíaco y compensando así, en parte, la presión arterial.

Otros autores también relacionan el incremento de la presión arterial tras la ingesta de fructosa, con un aumento en la actividad del cotransportador GLUT5 (Slc2a5) del intestino, que incorpora fructosa y Na⁺, mejorando la absorción de ambos nutrientes, favoreciendo la aparición de HTA (Barone y cols., 2009).

5.1.5. CARACTERIZACIÓN DE PARÁMETROS GESTACIONALES Y DE SUPERVIVENCIA

Respecto al periodo gestacional de las madres estudiadas, podemos concretar como muestra la Tabla 5.1.5, que la ingesta excesiva de fructosa durante este periodo no altera el índice de fertilidad, ni de gestación, ni aparentemente el número de crías por camada. Sin embargo sí compromete la supervivencia de las crías lactantes en los primeros días, pues a lo largo de los primeros 7 días, murieron el 5% de las crías. Durante las dos semanas restantes de lactancia no se produjeron más muertes. Por tanto parece existir un momento clave en la transición entre gestación y lactancia que afecta a las madres y a las crías, respecto al metabolismo de la fructosa que puede acabar con la vida de las crías.

Tabla 5.1.5. Parámetros gestacionales y de supervivencia

	Control	Fructosa
Número de ratas hembras	6	6
Número de ratas gestantes	6	6
Número de partos con éxito	6	6
IF (%)	100	100
IG (%)	100	100
Número de crías por camada	11,8 ± 0,6	11,1 ± 1,8
Número de crías nacidas vivas	71	67
INV (%)	100	100
Numero de crías vivas a los 7 días	71	64
IV (%)	100	95,5
Número de crías vivas al final de la lactancia	71	64
IS (%)	100	95,5

Los resultados son expresados como la media ± ESM. Control vs Fructosa. IF= Índice de fertilidad, IG= Índice de gestación, INV= Índice de nacidos vivos, IV= Índice de viabilidad, IS= Índice de supervivencia

5.2. DISTRIBUCIÓN DE SELENIO EN MADRES LACTANTES

5.2.1. BALANCE DE SE

La ingesta de Se en las madres del grupo fructosa es significativamente menor durante la lactancia ($p < 0,05$), dato que coincide con la menor ingesta sólida, como se describe en la Tabla 5.1.1, no así durante la gestación. Al final

de la lactancia, el Se eliminado por orina en las madres del grupo fructosa también es menor que en las del grupo control ($p<0,05$). Por ello, como se ve en la Tabla 5.2.1, a pesar de intentar evitar la excreción de Se urinaria, la retención de Se en las madres del grupo fructosa es considerablemente inferior que en las del grupo control ($p<0,05$). Así, las cantidades de este nutriente, fundamental para la vida, están comprometidas en estas ratas, aunque los niveles de Se se mantengan estables en sangre.

Tabla 5.2.1. Balance de Selenio en madres al final de la lactancia

		Control	Fructosa
Ingesta Se ($\mu\text{g}/\text{día}$)	Gestación	$1,85 \pm 0,04$	$1,83 \pm 0,11$
	Lactancia	$4,49 \pm 0,30$	$3,54 \pm 0,21^*$
Se en suero (ng/mL)		$314,64 \pm 6,37$	$304,33 \pm 8,87$
Se en heces ($\mu\text{g}/\text{día}$)		$0,148 \pm 0,007$	$0,153 \pm 0,022$
Se en orina ($\text{ng}/\text{día}$)		$265,02 \pm 2,57$	$229,32 \pm 12,69^*$
Absorción aparente de Se (%)		$96,26 \pm 0,27$	$95,87 \pm 0,78$
Retención de Se ($\mu\text{g}/\text{día}$)		$4,08 \pm 0,30$	$3,16 \pm 0,21^*$

Los resultados son expresados como la media \pm ESM. N° de animales=6.

Control vs Fructosa $^*p<0,05$.

5.2.2. DISTRIBUCIÓN TISULAR DE SELENIO

Aunque los niveles de Se en suero de ambos grupos fueron similares, la menor retención de este nutriente encontrado en el grupo fructosa, por vez primera, justificaron analizar los depósitos tisulares de este nutriente en ambos grupos. Por ello, la Figura 5.2.2 muestra la concentración de este mineral en distintos órganos al final de la lactancia en madres, observándose desiguales valores de Se en los tejidos estudiados a excepción del páncreas. Así, destaca el aumento significativo de los depósitos de Se en el hígado y riñón de las madres del grupo fructosa ($p<0,05$); y la depleción significativa encontrada en el corazón ($p<0,05$) y en el músculo ($p<0,001$). En este último tejido, la concentración de Se es extremadamente inferior a las madres del grupo control, siendo la mitad.

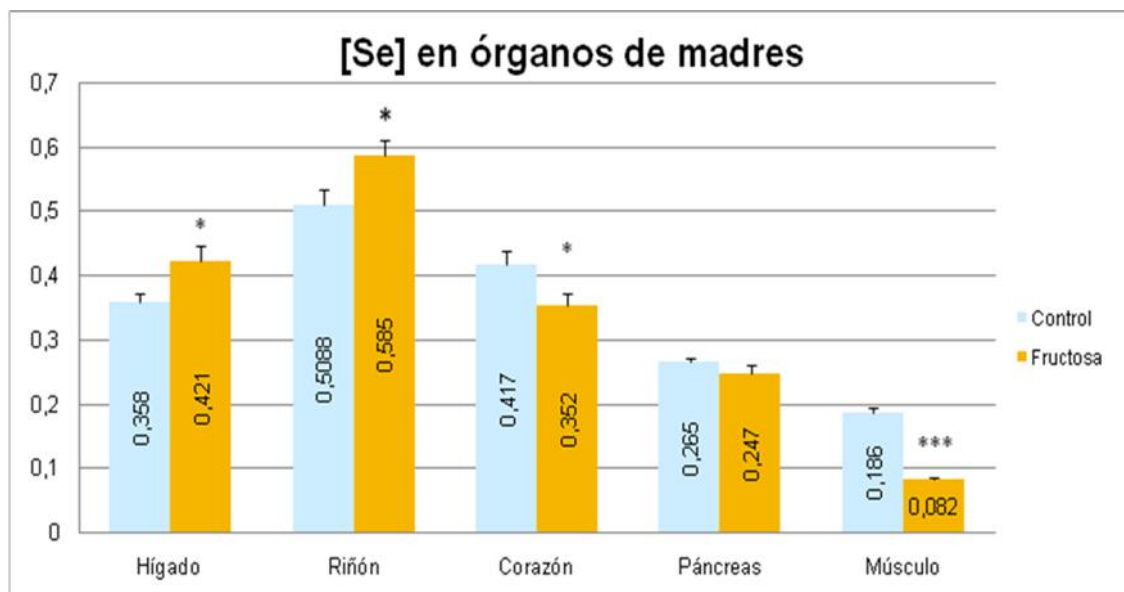


Figura 5.2.2. Concentración de Se en órganos de madres (µg/ g tejido seco). Los resultados son expresados como la media \pm ESM. N° de animales= 6. Control vs Fructosa * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

La repleción hepática y renal de Se encontrada en las madres fructosa podría estar relacionada con el papel antioxidante que juega este mineral mediante la síntesis de la selenoproteína antioxidante GPx. Es un hecho que las dietas ricas en fructosa favorecen el EO generando ROS (Sreeja y cols., 2014, Delbosc y cols., 2005), y que el SM en animales de experimentación provoca un aumento significativo del EO en hígado y riñón (Reddi and Bollineni, 2001, Seale y cols., 2012). Por ello, el incremento de Se en estos tejidos parece obedecer a una compensación oxidativa, aumentando los niveles de GPx en estos tejidos. Sin embargo, lo que parece ser una acción protectora, podría ser un arma de doble filo, pues se ha demostrado que una superproducción de GPx hepática está relacionada con la aparición de RI y dislipemia (Zhou y cols., 2013, Steinbrenner y cols., 2013). Como se mencionó anteriormente (Bonomini y cols. 2015), la producción de ROS en el hígado es necesaria para un correcto funcionamiento de la cascada de señalización de la insulina, si la GPx disminuye estos valores, puede afectar a la acción de la insulina, y por tanto a la captación celular de glucosa y la glucemia.

El modelo de una dieta rica en fructosa para generar SM, está asociado a una progresión del daño renal, repercutiendo sobre la estructura y funcionalidad de este tejido. Esta acción parece recaer en diversos

mecanismos no bien elucidados, algunos de ellos relacionados con la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) y los niveles de NO (Abdulla y cols., 2011). Por ello el secuestro de Se hacia estos órganos podría deberse en parte a un intento de incrementar la síntesis de GPx para mejorar el balance oxidativo.

Por otro lado, la retención de Se por parte del hígado y el riñón en madres fructosa, hace que otros tejidos vean comprometidos sus depósitos de Se. Tal es el caso del corazón y el músculo. En el caso del músculo, este resultado podría ser previsible, pues en condiciones normales el músculo, tras el hígado, es el segundo tejido de reserva de Se en el organismo (Daniels, 1996; Jotty y cols., 2009), cediendo Se a otros tejidos cuando los niveles de este nutriente disminuyen. Sin embargo, en esta situación de SM, el músculo esquelético juega un papel muy importante, pues este tejido es el que presenta mayor sensibilidad a la insulina. En este tejido las ROS también contribuyen a la cascada de señalización de la insulina (Stump y cols., 2006), por ello la gran disminución de Se encontrada tras el consumo de fructosa, podría estar contribuyendo a un desbalance oxidativo y de la cascada de señalización de la insulina.

Aunque el estudio del papel del Se en este tejido en relación al SM parece ser una diana experimental, aún nos parece más significativo la depleción de Se encontrada en el corazón tras el consumo de fructosa, pues este no es un tejido reservorio de Se, y se conoce la relación de este mineral con el buen funcionamiento cardíaco. Así, se ha demostrado que una dieta rica en fructosa inductora de SM, provoca HTA y activa mecanismos apoptóticos que terminan provocando fallo cardíaco (Cheng y cols., 2014). Además, se ha encontrado que una deficiencia de Se en corazón contribuye al desarrollo de fibrosis cardíaca y disfunción diastólica (Metes-Kosik y cols., 2012), así como la enfermedad cardíaca de Keshan (Chen, 2012). En este contexto, Xu y cols. (2011) encontraron que un tratamiento con insulina y Se restablece los niveles de glucosa y los mecanismos de señalización de la insulina disminuyendo la disfunción del miocardio en individuos con diabetes mejorando la actividad del receptor GLUT4 para glucosa y del IRS para la insulina en el corazón. Analizando los resultados obtenidos, las madres sometidas a una dieta rica en fructosa al final de la lactancia presentaron hipertensión, una baja frecuencia

cardíaca y una depleción de Se en el corazón. Esto sugiere, por primera vez, que los depósitos cardíacos de Se pueden jugar un papel importante en la disfunción cardíaca asociada al SM, y que dicha depleción podría ser considerado como un factor etiopatogénico para los problemas cardiovasculares relacionados con el SM.

Los resultados obtenidos de la distribución corporal de Se tras una dieta rica en fructosa al final de la lactancia, son controvertidos, y explicarían el papel dual de este mineral encontrado en la literatura relativo al SM y la RI. Quizás una suplementación con Se dirigida hacia el corazón podría ser beneficiosa.

Precisamente por el incremento de Se encontrado en hígado, y porque la actividad de la GPx puede interferir en la aparición de la RI típica del SM, unido a que la oxidación en este órgano parece jugar un papel importante en la génesis del SM (Bozkurt y cols., 2012; Zeng y cols., 2012); se ha medido la actividad de las cuatro enzimas antioxidantes endógenas (Figuras 5.2.3.1 y 5.2.3.2).

5.2.3. BALANCE OXIDATIVO HEPÁTICO

La actividad antioxidante de las enzimas SOD y CAT (Figura 5.2.3.1), GPx y GR (Figura 5.2.3.2), así como la medida de la oxidación de los lípidos y las proteínas hepáticas (Figura 5.2.3.3) en madres al final de la lactancia, muestran que el consumo de una dieta rica en fructosa durante este periodo altera claramente el balance oxidativo hepático.

Así, en la Figura 5.2.3.1 se observa que la actividad de la enzima SOD, primera en actuar en la cascada de las enzimas antioxidantes endógenas, transformando el anión superóxido en H_2O_2 , está disminuida en las madres del grupo fructosa ($p < 0,05$). Por el contrario, la actividad de la catalasa, cuyo sustrato es el H_2O_2 , está significativamente aumentada en este grupo con respecto a las del grupo control.

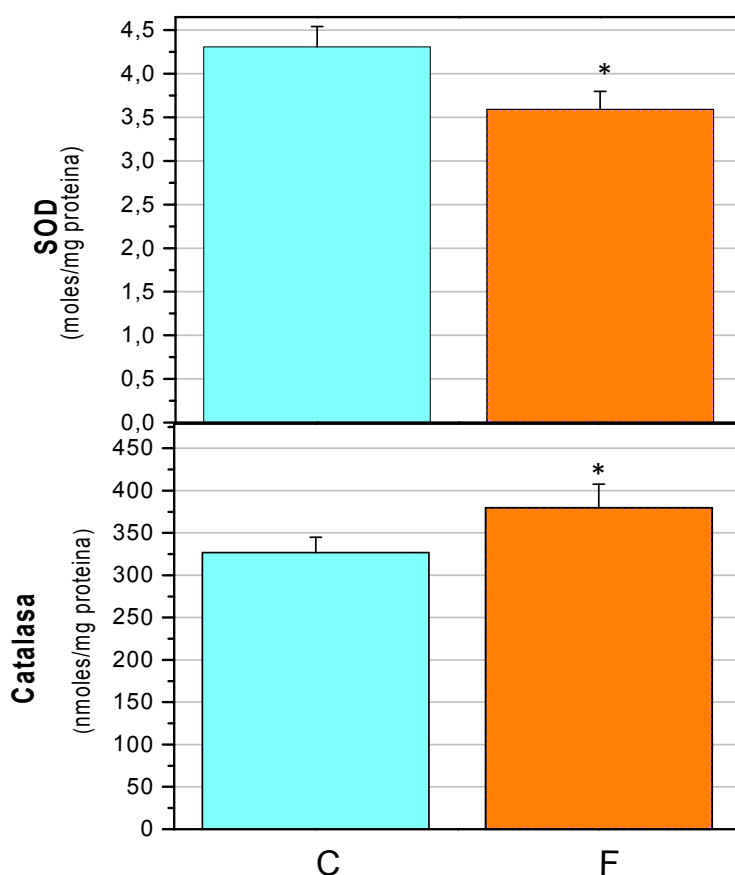


Figura 5.2.3.1. Actividad hepática de la SOD y CAT en madres lactantes. Los resultados son expresados como la media \pm ESM. N° de animales= 6. Control vs Fructosa. Significación: * $p < 0,05$.

En la Figura 5.2.3.2 se puede observar como en el hígado la actividad de la enzima GPx está aumentada en las madres del grupo fructosa ($p < 0,05$), aunque en la actividad de la GR no se encuentran diferencias; por ello, la ratio GR/GPx se ve significativamente disminuida en las madres del grupo fructosa ($p < 0,05$).

Este aumento de la actividad GPx coincide con el aumento de los depósitos tisulares de Se en este tejido, y favorece la transformación de H_2O_2 en agua. Esta acción detoxificante de la GPx, que a priori parece beneficiosa para el organismo, puede ser un arma de doble filo.

Aunque existe la teoría que el incremento de las ROS aumenta el daño oxidativo, cada vez más experimentos confirman que ciertos niveles controlados de ROS funcionan como señales moleculares esenciales para

diferentes procesos fisiológicos, entre ellos la cascada de señalización de la insulina (Mahadev y cols., 2001).

Según los estudios más recientes, la comunidad científica defiende que las ROS “buenas” se generan en sitios específicos y las “malas” de manera generalizadas (Wang y cols., 2014), de este modo la mayor actividad de la GPx hepática estaría actuando indistintamente sobre ambas. En concreto la GPx1 hepática se ha visto que está implicada en la destrucción de las ROS activadoras de la cascada de insulina (McClung y cols., 2004, Loh y cols., 2009).

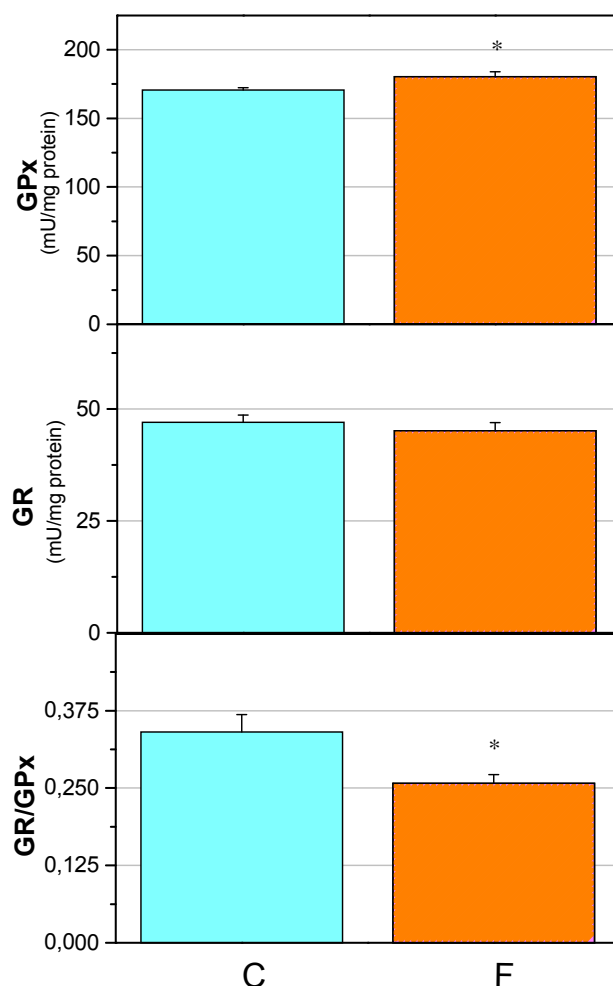


Figura 5.2.3.2. Actividad hepática de la GPx y la GR en madres lactantes. Ratio GR/GPx. Los resultados son expresados como la media \pm ESM. N° de animales= 6. Control vs Fructosa * $p < 0,05$.

Por otro lado, hay que tener en cuenta que la mayor fuente de producción de ROS en el SM son las enzimas NADPH oxidasa (Fortuño y cols., 2006, Elnakish y cols., 2013) y la Xantina Oxidasa (XO), que generan anión superóxido y H_2O_2 .

En este contexto, Feoli y cols. (2014) encontraron una correlación negativa entre la actividad de la SOD y la XO, y numerosos autores han encontrado una disminución de la actividad de la SOD en pacientes con SM (Armutcu y cols., 2008, Yubero-Serrano y cols., 2013).

La disminución de la actividad SOD en madres lactantes expuestas a una dieta rica en fructosa, implica una menor transformación de la especie altamente oxidante superóxido a H_2O_2 , dando lugar a una menor detoxificación de este anión, pudiendo ser en parte el detonante de la oxidación que aparece en el SM. La relación entre la actividad SOD y el SM aún no está clara, sin embargo algunos autores la consideran el biomarcador más relevante de estrés oxidativo en el desarrollo y gravedad de un SM (Yubero-Serrano y cols., 2013).

Por el contrario, el H_2O_2 es combatido por la acción de la CAT y la GPx, y deben venir de otras fuentes diferentes a la SOD, probablemente la XO, necesaria para la síntesis de ácido úrico, que se encuentra muy elevado tras el consumo de fructosa (Jia y cols., 2014). A pesar de ello, esta acción es insuficiente, pues las ratas fructosa presentan oxidación lipídica en el hígado (Figura 5.2.3.3), coincidiendo con los trabajos de Apaijai y cols., (2012).

La medida de la oxidación de los lípidos en el hígado, como se observa en la Figura 5.2.3.3, está muy aumentada en el grupo fructosa frente al control ($p < 0,01$), sin embargo, la oxidación de proteínas es similar en ambos grupos. Este incremento en la oxidación de lípidos hepáticos en madres fructosa, se debe en parte a la alta concentración lipídica hepática que presentan estas ratas.

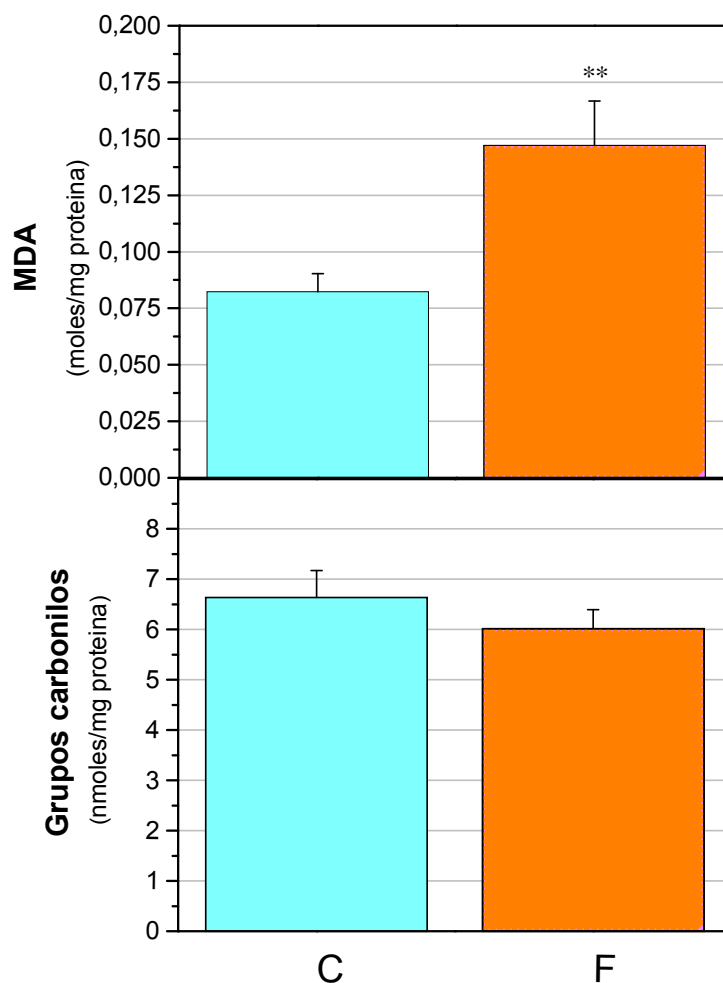


Figura 5.2.3.3. Niveles de oxidación de lípidos (MDA) y de proteínas (Grupos Carbonilos) en hígado de madres lactantes. Los resultados son expresados como la media \pm ESM. N° de animales= 6. Control vs Fructosa ** $p<0,01$.

5.3. ANÁLISIS NUTRICIONAL, MORFOLÓGICO Y METABÓLICO EN CRÍAS

5.3.1. ESTADO NUTRICIONAL Y PARÁMETROS MORFOLÓGICOS

En la Tabla 5.3.1.1 se evidencia que las crías del grupo fructosa nacieron con un peso mayor ($p<0,001$) y una talla menor ($p<0,001$) que las del grupo control. Es por esto que su IMC al nacer también era mayor ($p<0,001$) que las del grupo control.

Estos resultados se corresponden con los obtenidos por Mukai y cols. (2012), que confirman que las crías nacidas de madres alimentadas con

fructosa, nacen más pequeñas pero con un mayor peso. La obesidad, indicada por el IMC, es una carga oxidativa que puede conducir a la reducción de las actividades de las enzimas antioxidantes e inflamación y juega un papel patogénico en el desarrollo y la progresión del SM (Chen y cols., 2012).

Tabla 5.3.1.1. Estado nutricional y parámetros morfológicos de las crías al nacer

	Control	Fructosa
Peso al nacer (g)	5,11 ± 0,06	5,45 ± 0,06***
Talla al nacer (cm)	4,87 ± 0,04	4,57 ± 0,05***
IMC al nacer (Kg/m²)	2,20 ± 0,019	2,68 ± 0,063***

Los resultados son expresados como la media ± ESM. N° de animales = 71/64.
Control vs Fructosa *** $p < 0,001$.

Al final de la lactancia, en la Figura 5.3.1.1 se observa cómo se invierten algunos de estos parámetros, ya que a los 21 días los pesos de las hembras y de los machos del grupo fructosa son extremadamente inferiores a las hembras y machos controles ($p < 0,001$). En el caso de la talla, las hembras fructosa son más pequeñas de forma muy significativa, al igual que los machos ($p < 0,01$, $p < 0,05$).

El IMC en el caso de los machos fructosa es inferior que en las controles ($p < 0,05$). Sin embargo, en las hembras fructosa la disminución de talla y peso es más homogénea y por tanto, el IMC no es significativamente menor. Esto concuerda con los estudios de Chen y cols. (2010), donde confirma que las crías de 21 días nacidas de madres alimentadas con una dieta rica en fructosa, son más pequeñas y pesan menos que las del grupo control.

Este cambio de tendencia durante la lactancia en crías fructosa coincide con el menor índice de viabilidad encontrado en estas ratas (Tabla 5.1.5), que indica que la transición hacia la lactancia es un punto clave para este grupo de animales. Todos estos cambios se deben, en parte, a que las crías fructosa ingieren significativamente menor cantidad de leche que las controles, al menos, al final de la lactancia (Tabla 5.4.1).

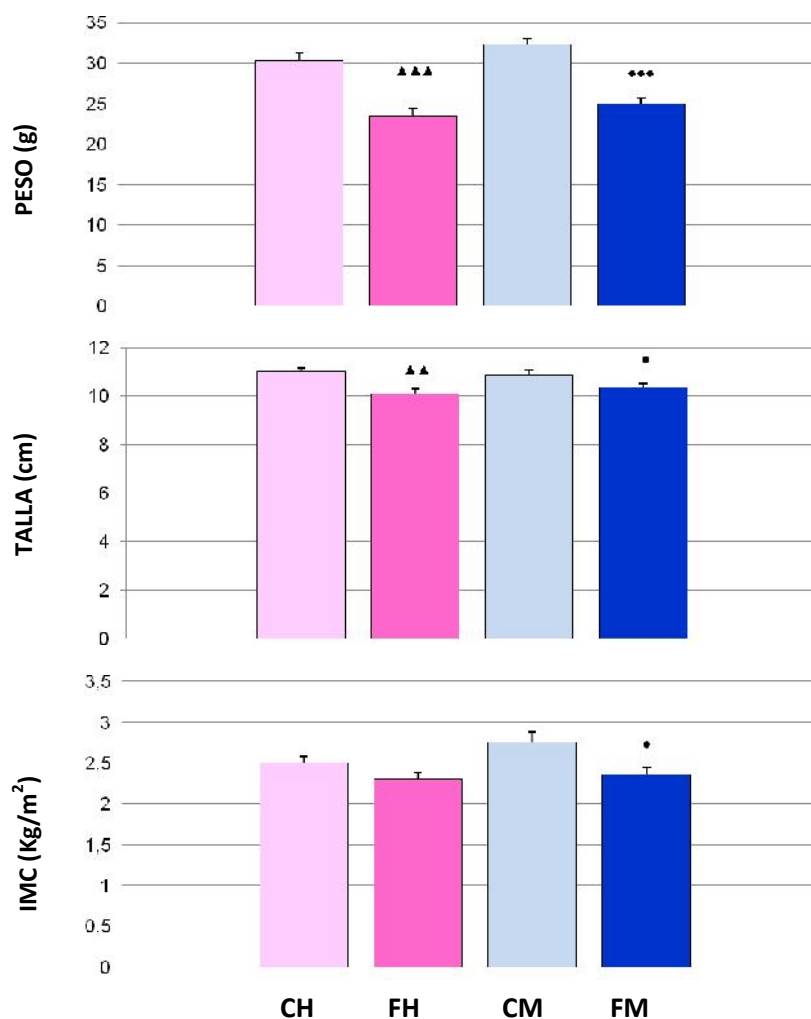


Figura 5.3.1.1. Parámetros morfológicos de las crías de 21 días por sexo. Los resultados son expresados como la media \pm ESM. Grupos: control hembras CH, fructosa hembras FH, control machos CM y fructosa machos FM. N° de animales= 15/12/18/13. Significación: CH vs FH $p < 0,01$, $p < 0,001$; CM vs FM $p < 0,05$, $p < 0,001$.

La Figura 5.3.1.2 muestra que en las crías fructosa la circunferencia torácica y la circunferencia abdominal son significativamente menores que en las controles, siendo esta disminución más significativa en machos ($p < 0,001$). Esta mayor disminución en los machos puede estar relacionada con que, en condiciones fisiológicas, las crías machos controles presentan mayor circunferencia torácica y abdominal que las hembras, debida a la acción de la testosterona sobre el desarrollo óseo y muscular, y por tanto los efectos son más llamativos.

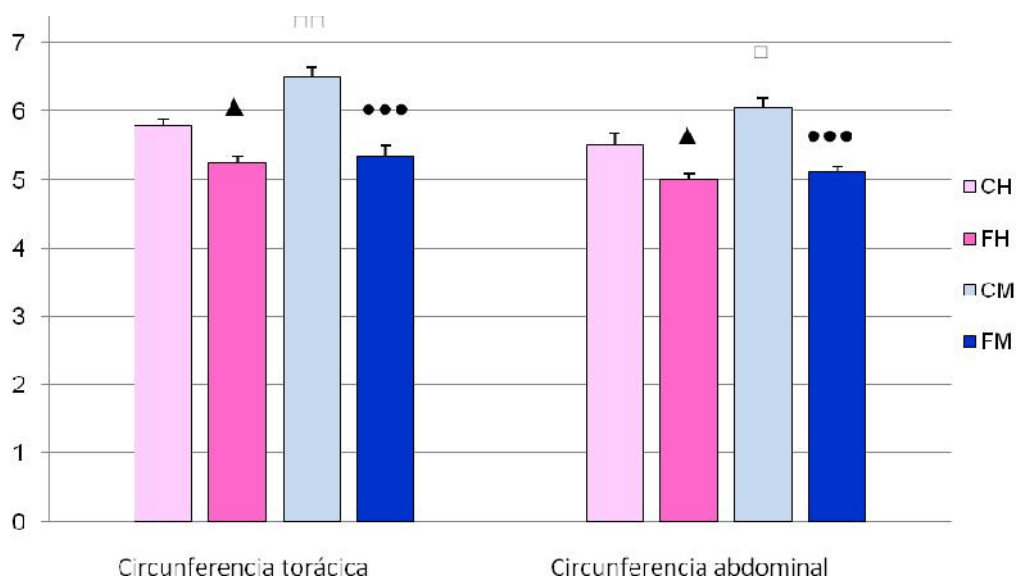


Figura 5.3.1.2. Circunferencia torácica y abdominal de crías de 21 días por sexo. Los resultados son expresados como la media \pm ESM. Grupos: control hembras CH, fructosa hembras FH, control machos CM y fructosa machos FM. N° de animales= 15/12/18/13. Significación: CH vs FH $p < 0,05$; CM vs FM $p < 0,001$, CH vs CM $p < 0,05$, $p < 0,01$.

Los valores del IOS del hígado y corazón en las hembras fructosa, como muestra la Tabla 5.3.1.2, son mayores que en las controles ($p < 0,05$), no así en los machos. Esto confirmaría que la dieta rica en fructosa ingerida por las madres durante la lactancia, repercute en las crías lactantes, especialmente las hembras, provocando al igual que en las madres una hepatomegalia y según Tappy y Lê (2012) posible esteatosis, junto con una cardiomegalia. No hay diferencias significativas en el resto de los órganos.

Tabla 5.3.1.2. Índice organosomático (IOS) en crías de 21 días (%) según sexos.

	CH	FH	CM	FM
Hígado	3,321 \pm 0,075	3,502 \pm 0,069	3,439 \pm 0,077	3,411 \pm 0,044
Corazón	0,628 \pm 0,021	0,735 \pm 0,022	0,624 \pm 0,026	0,652 \pm 0,023
Páncreas	0,407 \pm 0,020	0,366 \pm 0,009	0,413 \pm 0,032	0,365 \pm 0,012
Riñón	1,438 \pm 0,056	1,439 \pm 0,0341	1,329 \pm 0,071	1,398 \pm 0,031
Músculo	0,596 \pm 0,067	0,619 \pm 0,047	0,764 \pm 0,070	0,819 \pm 0,075

Los resultados son expresados como la media \pm ESM. Grupos: control hembras CH, fructosa hembras FH, control machos CM y fructosa machos FM. N° de animales= 15/12/18/13. Significación: CH vs FH $p < 0,05$.

5.3.2 ANÁLISIS DEL METABOLISMO LIPÍDICO Y GLUCÍDICO

El valor de la insulina sérica, el índice HOMA-IR y el porcentaje de células funcionales en las crías fructosa de ambos sexos están extremadamente disminuidas frente a las controles, como se observa en la Tabla 5.3.2 ($p < 0,001$). Sin embargo, en las hembras fructosa, la disminución de estos parámetros son significativamente mayores que en los machos fructosa, encontrándose, por tanto, una mayor susceptibilidad en las hembras frente a la respuesta a la insulina en presencia de fructosa, no así en condiciones normales.

Tabla 5.3.2. Perfil lipídico y glucídico en crías al final de la lactancia.

	CH	FH	CM	FM
Triglicéridos (mg/dL)	83,6 ± 3,39	93,75 ± 9,43	98,5 ± 12,09	93,5 ± 4,34
Colesterol (mg/dL)	156,56 ± 1,39	154 ± 2,25	158 ± 4,48	156 ± 2,83
Glucosa (mg/dL)	172,63 ± 9,61	144,00 ± 10,52	148,67 ± 5,05	150,80 ± 7,64
Insulina sérica (mUI/L)	0,0515 ± 0,0046	0,0125 ± 0,0009	0,0427 ± 0,0025	0,0201 ± 0,0018
Índice HOMA-IR	0,0211 ± 0,0017	0,0036 ± 0,0002	0,0187 ± 0,0011	0,0081 ± 0,0008
Células β funcionales (%)	0,233 ± 0,008	0,058 ± 0,004	0,207 ± 0,014	0,108 ± 0,008

Los resultados son expresados como la media \pm ESM Grupos: control hembras CH, fructosa hembras FH, control machos CM y fructosa machos FM. Nº de animales= 15/12/18/13. Significación: CH vs FH $p < 0,001$; CM vs FM $p < 0,001$; FH vs FM $p < 0,05$, $p < 0,01$.

5.4. DISTRIBUCIÓN DE SELENIO EN CRÍAS LACTANTES

5.4.1. BALANCE DE SE

Como se observa en la Tabla 5.4.1, la ingesta de leche y con ello, la ingesta de Se, es significativamente menor en las crías del grupo fructosa ($p > 0,01$). Además, la concentración de Se en orina es menor en las crías

fructosa ($p < 0,001$), así como en heces ($p < 0,05$), lo que indica que estas crías hacen un esfuerzo por retener este micronutriente esencial.

Como reseñamos anteriormente, aunque las madres del grupo fructosa excretan menos Se por heces y orina, su retención es menor que en las controles porque ingieren menos Se en dieta. Sin embargo, esta menor retención materna no afecta a la concentración de Se en leche, debido en parte, a los esfuerzos realizados por mantener los niveles de Se en suero equilibrado a expensas de otros tejidos. Se sabe que los niveles de Se en leche dependen de los niveles de Se en suero. Sin embargo, a efectos finales, las crías fructosa reciben menos Se en dieta al ingerir menos cantidad de leche.

Tabla 5.4.1. Balance de Selenio en crías de 21 días.

	Control	Fructosa
Ingesta de leche (g/30 min)	$0,64 \pm 0,04$	$0,46 \pm 0,04^{**}$
Se en leche ($\mu\text{g/mL}$)	$0,265 \pm 0,011$	$0,261 \pm 0,008$
Ingesta Se ($\mu\text{g/toma}$)	$0,166 \pm 0,012$	$0,117 \pm 0,009^{**}$
Se en orina (ng/día)	$10,72 \pm 0,58$	$3,01 \pm 0,31^{***}$
Se en heces (ng/día)	$2,47 \pm 0,19$	$1,87 \pm 0,15^*$

Los resultados son expresados como la media \pm ESM. N° de animales= 33/25. Control vs Fructosa

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

5.4.2. DEPÓSITOS TISULARES DE SE

En la Figura 5.4.2.1. se muestra cómo la concentración de Se en el suero es menor en machos que en hembras controles ($p < 0,05$), sin existir diferencias significativas en las crías del grupo fructosa.

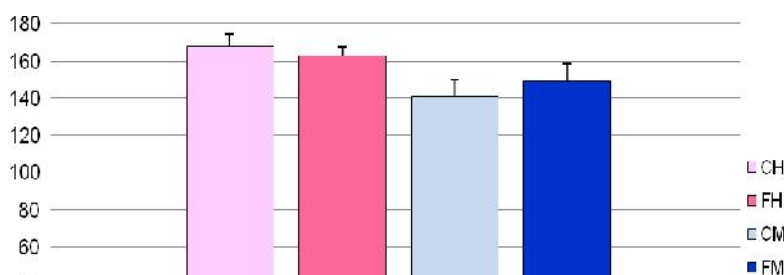


Figura 5.4.2.1. Concentración de Selenio en suero de crías de 21 días por sexo (ng/mL). Los resultados son expresados como la media \pm ESM Grupos: control hembras CH, fructosa hembras FH, control machos CM y fructosa machos FM. N° de animales= 15/12/18/13. Significación: CH vs CM $p < 0,05$.

Se observa en la Figura 5.4.2.2 que en las crías del grupo fructosa, la concentración de Se está aumentada en el hígado de las hembras ($p<0,05$) y en el riñón de las crías de ambos sexos ($p<0,001$).

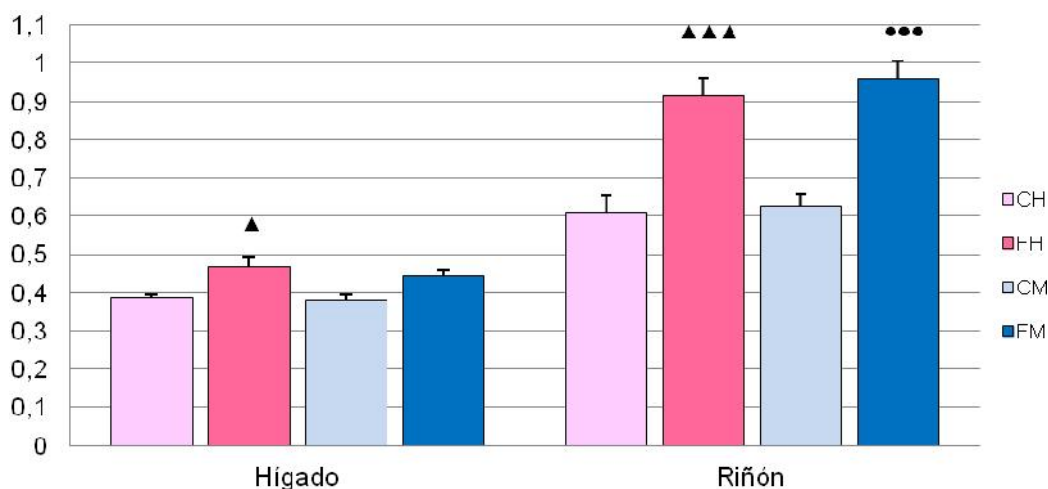


Figura 5.4.2.2. Concentración de Se en órganos de crías de 21 días ($\mu\text{g/g}$ tejido seco).

Los resultados son expresados como la media \pm ESM Grupos: control hembras CH, fructosa hembras FH, control machos CM y fructosa machos FM. N° de animales= 15/12/18/13. Significación: CH vs FH $p<0,05$, $p<0,001$; CM vs FM $p<0,001$.

Según muestran los valores de la Figura 5.4.2.3, la concentración de Se en el páncreas de las crías fructosa de ambos sexos, se encuentra aumentada ($p<0,05$); sin embargo las concentraciones de Se en músculo y corazón de las crías fructosa están deplecionadas drásticamente frente a las del grupo control ($p<0,05$; $p<0,001$).

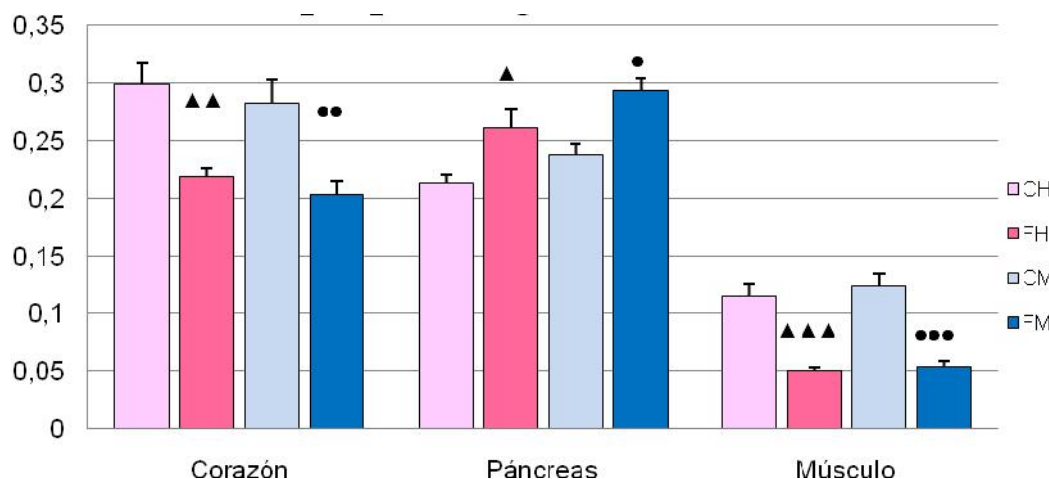


Figura 5.4.2.3. Concentración de Se en órganos de crías de 21 días (µg/ g tejido seco).

Los resultados son expresados como la media \pm ESM Grupos: control hembras CH, fructosa hembras FH, control machos CM y fructosa machos FM. N° de animales= 15/12/18/13. Significación: CH vs FH $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$; CM vs FM $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$.

Podemos concluir que a pesar de que las crías fructosa ingieren menor cantidad de Se, presentan similares concentraciones de este elemento en suero, y que la exposición durante la gestación y lactancia a una dieta rica en fructosa, provoca cambios significativos en la distribución tisular de Se en las crías. Así, las hembras muestran una repleción de Se en hígado, riñón y páncreas, y los machos en riñón y páncreas. Esta repleción en algunos tejidos debe estar relacionada con la depleción encontrada en corazón y músculo, y con la menor excreción de Se por heces y orina encontrada en estas crías.

A excepción del páncreas, los cambios en la distribución tisular de Se son parecidos a los encontrados en madres, sobre todo en hembras. Así, podemos llegar a conclusiones similares, pues a pesar de que las dietas ricas en fructosa durante la lactancia, disminuyen la ingesta de Se con propiedades antioxidantes, y que diversos estudios han demostrado que las dietas ricas en fructosa favorecen el estrés oxidativo en hígado y riñón (Reddi y Bollineni, 2001, Seale y cols., 2012), el incremento de los depósitos de Se encontrados en hígado y riñón puede obedecer a una compensación oxidativa, aumentando la acción antioxidante de la GPx. Teniendo en cuenta que en el caso del hígado la interrupción de la oxidación puede provocar un mal funcionamiento de la cascada de señalización de la insulina (Bonomini et al, 2015), y por otra parte, que la repleción encontrada en el riñón de crías es muy

superior a la encontrada en madres, se señala a estos órganos como tejidos especialmente susceptibles a la fructosa en las crías.

Por otro lado, las crías fructosa presentan niveles elevados de Se en páncreas, lo que puede estar estrechamente relacionado con la pequeña cantidad de insulina que secretan estos animales. El páncreas es un órgano con escasas defensas antioxidantes (Lenzen y cols., 1996), y por ende con baja actividad GPx (Grankvist y cols., 1981). Así, se ha observado que las ROS en general, disminuyen la secreción de insulina estimulada por glucosa de las células- de los islotes pancreáticos (Pi y cols., 2009; Iwakami y cols., 2011) y oxidan los ácidos grasos de membranas celulares pancreáticas (Giacca y cols., 2011). Además, se ha observado que en ratones Knock-out GPx1 existe una disminución de la liberación de insulina por las células- frente a estímulos de glucosa, y que una suplementación con selenito sódico aumenta la secreción de insulina por dichas células (Wang y cols., 2014). Es más, en esta línea, la sobreexpresión de GPx4, enzima especializada en disminuir la oxidación de lípidos de membrana (Brigelius-Flohé, 1999), previene la disfunción de las células- tras una exposición continua a lípidos en ratas (Koulajian y cols., 2013). Por todo ello podemos pensar que el aumento de Se encontrado en este tejido puede ser un mecanismo para incrementar la actividad de la GPx, defendiendo la integridad de las células- , y así la síntesis de insulina, drásticamente disminuida en estos grupos de animales (cinco veces en hembras y dos en machos) como muestra la Tabla 5.3.2.

Además, al igual que en madres, corazón y músculo disminuyen sus depósitos de Se. Si bien el músculo es el segundo reservorio de Se en el organismo y cede Se a otros tejidos cuando los necesitan, también presenta gran sensibilidad a la insulina, y por tanto, un desbalance oxidativo puede alterar la cascada de señalización de la insulina, y ésto contribuir al desarrollo de RI. Sin embargo el corazón, hasta la fecha, no se considera un tejido reservorio de Se, es más, se conoce la relación de este mineral con el buen funcionamiento cardíaco. Por todos los mecanismos comentados en el apartado 5.2.2 podemos aventurar que los depósitos cardíacos de Se pueden jugar un papel importante en la disfunción cardíaca asociada al SM, y que dicha depleción podría ser considerada como un factor etiopatogénico para los

problemas cardiovasculares relacionados con el SM en madres y crías. De hecho, Ayaz y Turan (2006) encontraron que la suplementación moderada durante cuatro semanas con selenito sódico prevenía el daño en la disfunción contráctil cardíaca encontrado en ratas con DM2, restaurando el ciclo redox de los cardiomiocitos y las concentraciones intracelulares de Zn.

La distribución corporal de Se encontrada en crías del grupo fructosa explicaría, en parte, el papel dual de este mineral en el SM, la RI y la suplementación o déficit de este nutriente. Quizá una suplementación con Se dirigida hacia el corazón podría ser beneficiosa.

5.5. EXPRESIÓN DE LAS SELENOPROTEÍNAS HEPÁTICAS EN CRÍAS

Precisamente por el incremento de Se encontrado en hígado de crías hembras expuestas a fructosa, y porque la actividad de la GPx y la SelP puede interferir en la aparición de la RI típica del SM se ha analizado la expresión hepática de las selenoproteínas mayoritarias en hígado (Figura 5.5.1).

5.5.1. EXPRESIÓN DE LAS SELENOPROTEÍNAS HEPÁTICAS

Respecto a la expresión de las selenoproteínas hepáticas, encontramos diferencias entre los machos y las hembras del grupo fructosa. Esto está relacionado con los mayores valores de Se encontrado en el hígado de las hembras. Así, en las hembras, donde los niveles de Se están replecionados, encontramos un aumento significativo de la expresión de GPx1 ($p<0,05$), GPx4 ($p>0,01$) y SelP ($p<0,05$) respecto a las hembras controles. En el caso de los machos, los del grupo fructosa presentaron una mayor expresión de GPx4 ($p<0,05$), lo que nos hace pensar que la mayor expresión de esta selenoproteína debe estar comprometiendo la síntesis de otras, y por ello le otorga un papel importante (Figura 5.5.1).

Steinbrenner y cols. (2011) demuestran que la expresión de GPx1 está aumentada en personas con RI; esta situación también se observa en ratas gestantes con esta misma patología (Zeng y cols, 2012). Como ya

comentamos, el supuesto papel antioxidante beneficioso que se le otorga a la enzima GPx1, puede ser un arma de doble filo a nivel hepático, pues se ha demostrado en diferentes trabajos que la GPx1 hepática está implicada directamente en la destrucción de las ROS activadoras de la cascada de insulina favoreciendo la aparición de RI (McClung y cols., 2004, Loh y cols., 2009, Briguelius-Flohé y Maiorino, 2013, Zhou y cols. 2013, Wang y cols., 2014). Incluso se ha demostrado que la expresión de GPx1 inhibe la fosforilación (activación) del mediador clave en la regulación del metabolismo energético, la proteína kinasa adenosina monofosfato (AMPK), en hígado, afectando así al metabolismo lipídico y de los carbohidratos regulados por la insulina (Steinbrenner, 2013). El incremento de GPx1 encontrado en las crías fructosa hembras puede ser indicativo del desbalance metabólico que tienen estas crías, que también presentan una mayor descompensación en sus niveles de insulina que los machos.

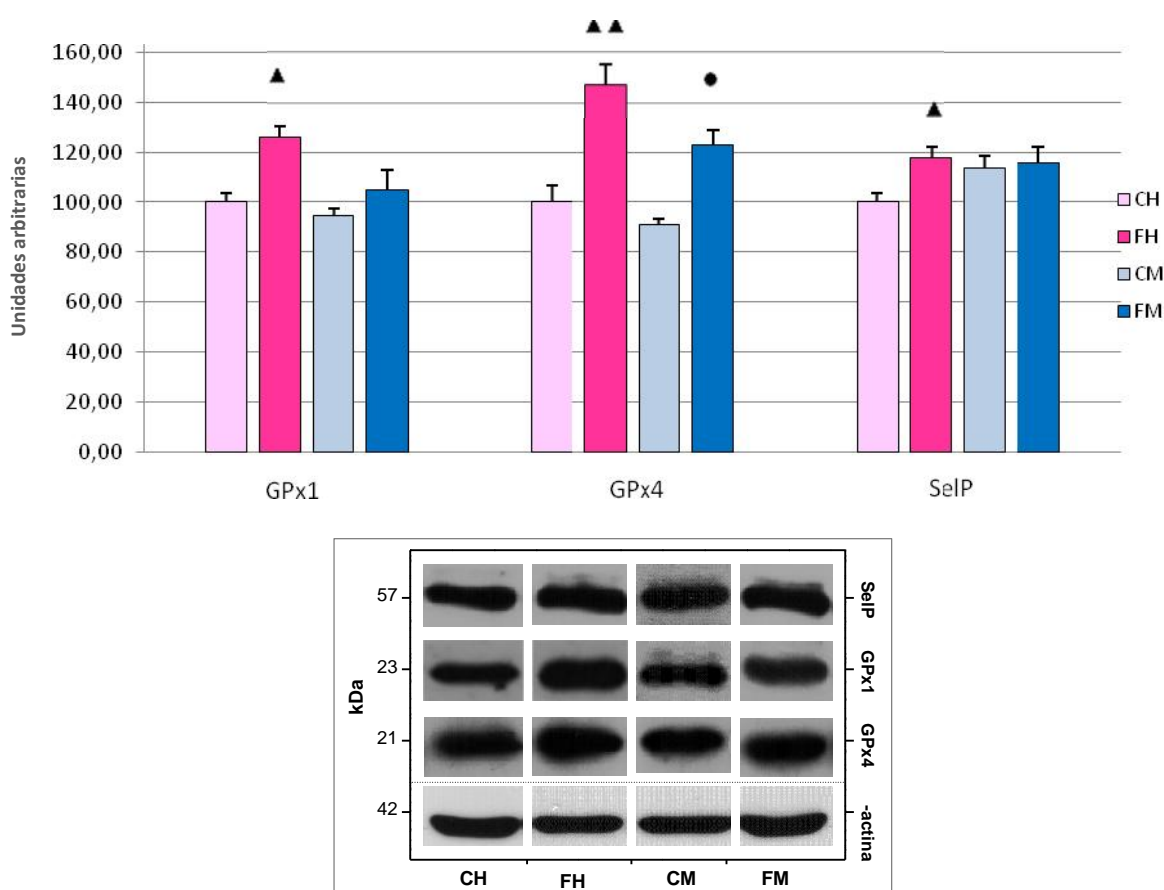


Figura 5.5.1. Expresión de selenoproteínas GPx1, GPx4 y SelP en hígado de crías de 21 días por sexos. Los resultados son expresados como la media \pm ESM Grupos: control hembras CH, fructosa hembras FH, control machos CM y fructosa machos FM. N° de animales= 15/12/18/13.

Significación: CH vs FH $p < 0,05$, $p < 0,01$; CM vs FM $p < 0,05$.

Respecto a la mayor expresión de SeIP en crías fructosa hembras, también está en consonancia con los mayores niveles de Se hepáticos encontrados en estas crías. Diversos estudios han encontrado niveles de SeIP elevados en pacientes con SM y DM2, por lo que se piensa, juega un papel en la regulación del metabolismo de la glucosa y la sensibilidad a la insulina (Yang y cols. 2011, Misu y cols., 2010). De hecho, se ha visto que la SeIP (selenoproteína mayoritaria en hígado) impide el correcto desarrollo de la cascada de señalización de la insulina, disminuyendo la actividad de la Akt y la fosforilación de la AMPK (Misu y cols., 2010). Además se ha comprobado que la síntesis hepática de la SeIP se inhibe por la insulina (Steinbrenner, 2013). Incluso recientemente se ha visto que el fármaco antidiabético metformina actúa disminuyendo la expresión de SeIP y activando a la AMPK, lo que sitúa a esta selenoproteína como una proteína diana para el tratamiento de la diabetes (Takayama y cols., 2014). También, recientemente, se ha analizado el papel de esta selenoproteína, altamente presente en plasma, en relación a la angiogénesis generada durante la diabetes. Parece que está también relacionada con el factor de crecimiento del endotelio vascular, y que su expresión altera, por tanto, la angiogénesis durante la diabetes (Ishikura y cols., 2014).

Los resultados obtenidos en el hígado de crías fructosa hembras son, en parte, previsibles, pues según la bibliografía comentada en los antecedentes, varios trabajos relacionan un aumento de la actividad de la GPx y de la expresión de las selenoproteínas SeIP y GPx1 en el hígado de ratas que presentan RI, alteración que provoca el consumo de fructosa. Por ello, una repleción de Se a nivel hepático en detrimento de otros tejidos favorece la expresión de estas proteínas. Sin embargo, no hay que olvidar que la fructosa provoca un aumento de las ROS, y que el EO se considera un factor a analizar seriamente en el desarrollo del SM (Bonomini y cols., 2015), y por tanto, un aumento de la actividad GPx contrarrestaría el desbalance oxidativo (Delbosc y cols., 2005).

Por último, destacar la mayor expresión de la GPx4 encontrada en el hígado de crías fructosa machos y hembras. Si bien, hasta la fecha, no se ha implicado esta proteína a nivel hepático con la aparición de RI, sí se ha

relacionado con el buen funcionamiento de las células- (Koulajian y cols., 2013). Al ser la única enzima GPx que favorece la reducción de hidroperóxidos en los lípidos de membrana y lipoproteínas (Brigelius-Flohé 1999), su sobreexpresión ha demostrado prevenir la disfunción de las células- tras una exposición continua a lípidos en ratas, ya que la oxidación de los ácidos grasos de membrana está directamente relacionada con la disminución de la síntesis de insulina por parte de las células- (Koulajian y cols., 2013).

Por otro lado, esta enzima es esencial para la supervivencia de los embriones y ratones neonatos, que mueren si no la expresan, e imprescindible para la integridad de las mitocondrias, la apoptosis y la supervivencia de las neuronas (Brigelius-Flohé 1999). Quizás por el estadio vital estudiado, esta enzima tenga una mayor importancia biológica, y frente a un estrés, como es la exposición prolongada a fructosa, se sobreexpresa en el hígado de machos y hembras. Resultados similares se encontraron en crías de madres expuestas a otro factor estresante (alcohol) durante la gestación y la lactancia (Jotty y cols., 2013).

5.5.2. RELACIÓN DE LAS SELENOPROTEÍNAS CON LOS DEPÓSITOS HEPÁTICOS DE SELENIO

Como muestra la Figura 5.5.2, tras el consumo de fructosa, las crías de ambos sexos destinan mayor parte de su Se hepático a la síntesis de GPx4 que las controles, siendo especialmente significativo en la hembras. En el caso de los machos, este incremento parece ser en parte a expensas de la síntesis de SelP, lo que demuestra, que la expresión de esa selenoproteína debe jugar un papel importante en esta etapa vital frente a la exposición de fructosa.

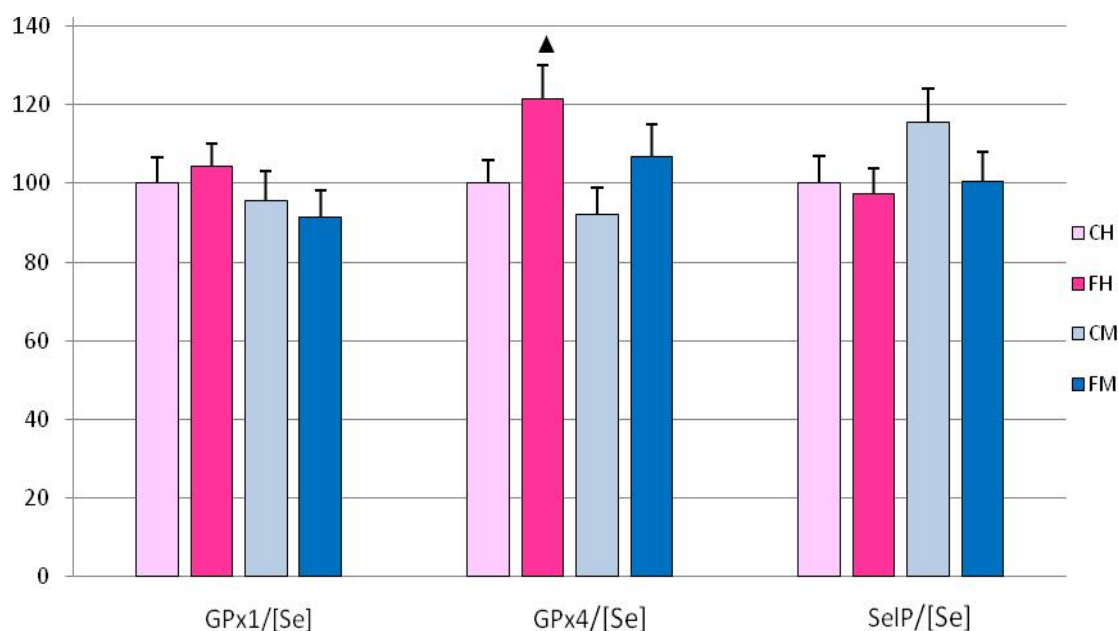


Figura 5.5.2. Ratio de la expresión de las selenoproteínas GPx1, GPx4 y SelP con la concentración de Se en hígado de crías de 21 días por sexos. Los resultados son expresados como la media \pm ESM Grupos: control hembras CH, fructosa hembras FH, control machos CM y fructosa machos FM. N° de animales= 15/12/18/13. Significación: CH vs FH $p < 0,05$.

5.6. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN HÍGADO DE CRÍAS LACTANTES

Los cambios en la expresión de las selenoproteínas estudiadas nos derivan al estudio de la actividad de la GPx hepática y de las otras tres enzimas antioxidantes endógenas no dependientes de Se: GR, SOD y CAT. Así podremos analizar el papel que estas enzimas juegan en la protección de las células contra el daño causado por las ROS (Naziroglu y Cay, 2001). Este análisis cobra especial relevancia porque se ha hipotetizado que en pacientes con SM, el EO está amplificado por una actividad antioxidante defectuosa, que favorece la propagación de las alteraciones oxidativas desde los espacios intracelulares a los extracelulares localizados en la distancia, favoreciendo el EO sistémico (Sahaf y cols., 2005; Vendemiale y cols., 1995).

5.6.1. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ANTIOXIDANTE

La actividad de la enzima antioxidante SOD (Figura 5.6.1) está significativamente disminuida en hembras y en machos fructosa ($p < 0,001$). Sin embargo, la actividad CAT sólo está significativamente aumentada en las hembras fructosa ($p < 0,01$) frente a las controles, principalmente porque los machos controles presentan mayor actividad hepática de la CAT que las hembras del mismo grupo ($p < 0,05$).

La disminución de la actividad SOD encontrada en las crías fructosa de ambos sexos, parece ser una constante en estudios de SM, que muestran que la actividad de esta enzima está claramente disminuida (Armutcu y cols., 2008, Yubero-Serrano y cols., 2013, Feoli y cols., 2014). El mismo resultado hemos obtenido también en madres (Figura 5.2.3.1). Esta disminución tiene una implicación muy importante en la lucha contra el EO, pues es la primera enzima en actuar frente a la ROS más dañina, el anión superóxido, para dar lugar al H_2O_2 que metabolizarán más tarde la CAT y la GPx. Estos datos concuerdan con la nueva tendencia que defiende Bonomini y cols., (2015) basada en que en el SM además de existir ROS, la actividad antioxidante es defectuosa favoreciendo el EO sistémico.

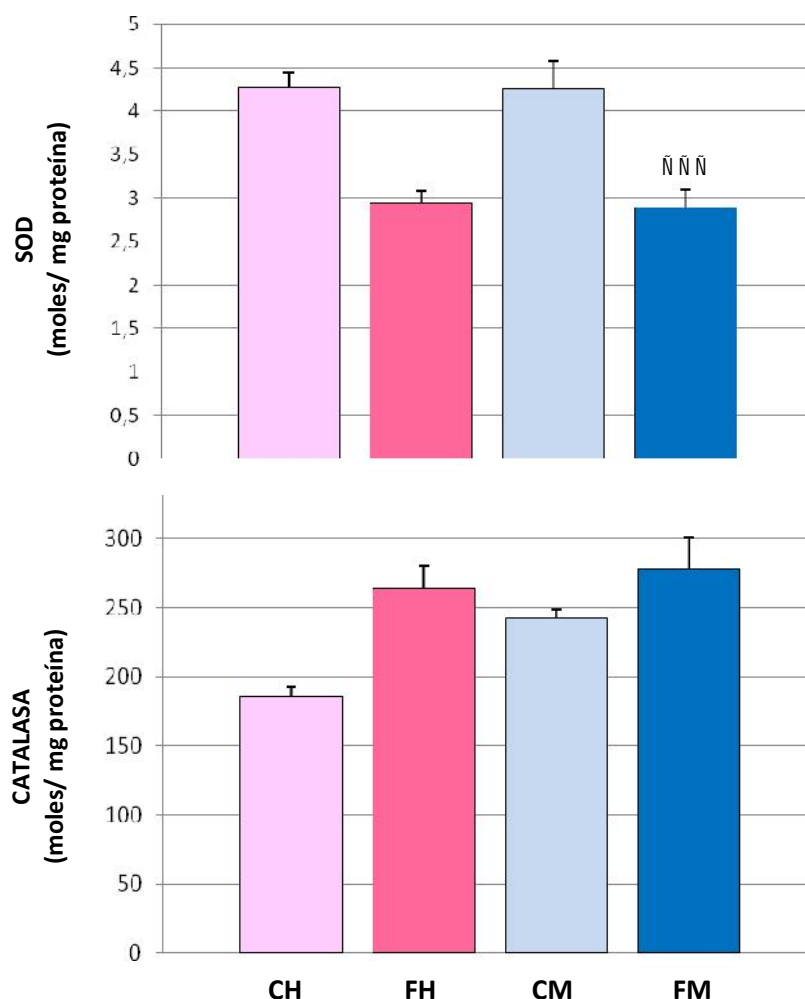


Figura 5.6.1.1. Actividad hepática de la SOD y la CAT en crías de 21 días. Los resultados son expresados como la media \pm ESM Grupos: control hembras CH, fructosa hembras FH, control machos CM y fructosa machos FM. N° de animales= 15/12/18/13. Significación: CH vs FH $p < 0,01$, $p < 0,001$; CM vs CF $p < 0,01$; CH vs CM $p < 0,05$.

En el caso de las hembras, al igual que en las madres, existe un aumento de la actividad CAT, que transforma las especies reactivas de H_2O_2 en agua; que, por otro lado, deben venir de fuentes diferentes a la SOD, probablemente de la XO. A pesar de ello, esta acción es insuficiente, pues las crías hembras fructosa presentan oxidación lipídica y proteica en hígado (Figura 5.6.2).

La Figura 5.6.1.2 muestra que en crías hembras fructosa existe un incremento de la actividad GPx, GR y de la ratio GR/GPx ($P < 0,05$, $p < 0,001$, $p < 0,01$). En machos se observa un incremento de la actividad GR y de esta

ratio ($p<0,01$, $p<0,05$) lo que implica una alta actividad reductora de esta enzima, favoreciendo la síntesis del antioxidante GSH.

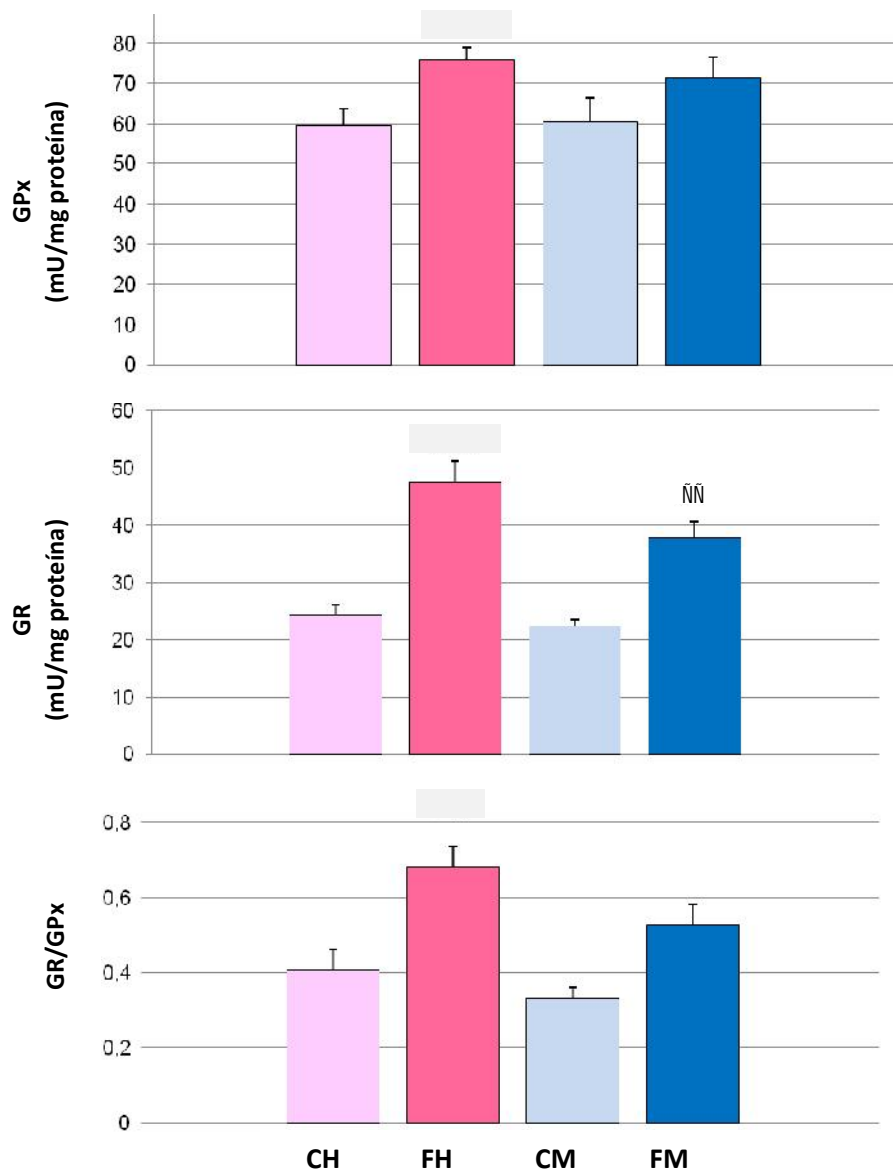


Figura 5.6.1.2. Actividad hepática de la GPx y la GR en crías de 21 días. Ratio GR/GPx. Los resultados son expresados como la media \pm ESM Grupos: control hembras CH, fructosa hembras FH, control machos CM y fructosa machos FM. N° de animales= 15/12/18/13. Significación: CH vs FH $p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,001$; CM vs CF $p<0,01$.

Los valores aumentados de la actividad antioxidante de la selenoproteína GPx encontrados en hembras fructosa, al igual que en madres, son proporcionales al aumento de los depósitos de Se en hígado (Figura 5.4.2.2) y a la expresión hepática de GPx1 y GPx4 (Figura 5.5.1). Esta mayor actividad favorece la eliminación de H_2O_2 , al igual que la CAT. Además la elevada ratio

GR/GPx indica el buen funcionamiento de este par enzimático, que aún no está saturado. Sin embargo, hay que recordar que una mayor actividad de GPx hepática, como defiende Misu y cols., (2010), está relacionada con el desarrollo de RI. Una vez más, esto demuestra que las crías hembras de las madres con SM inducido por fructosa sufren alteraciones mayores en su balance oxidativo que los machos.

5.6.2. NIVELES DE OXIDACIÓN DE LÍPIDOS Y PROTEÍNAS

En hembras fructosa, a pesar de estar elevada la actividad antioxidante GR/GPx y CAT, existe oxidación de lípidos ($p<0,01$) y proteínas ($p<0,05$). Indicando que la acción de estas enzimas es insuficiente para evitar la oxidación de biomoléculas (Figura 5.6.2).

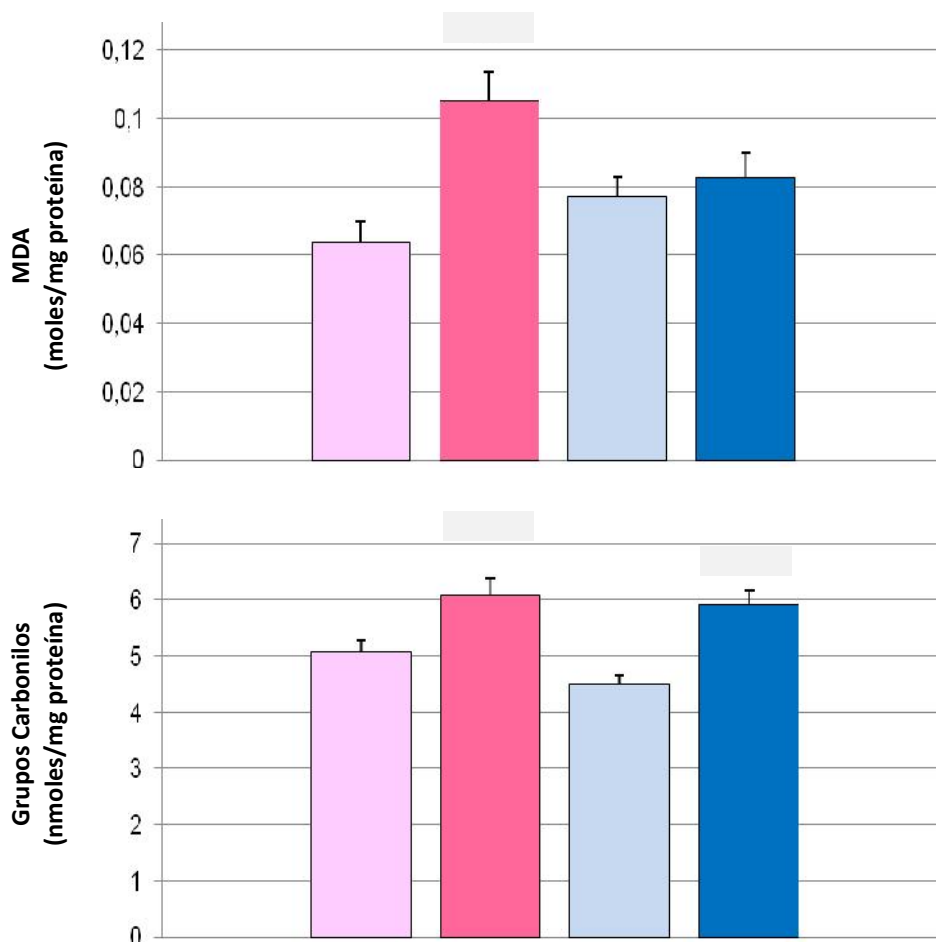


Figura 5.6.2. Niveles de oxidación de lípidos (MDA) y de proteínas (Grupos Carbonilos) en hígado de crías de 21 días. Los resultados son expresados como la media \pm ESM Grupos: control hembras CH, fructosa hembras FH, control machos CM y fructosa machos FM. N° de animales= 15/12/18/13. Significación: CH vs FH $p<0,05$, $p<0,01$; CM vs CF $p<0,05$.

La oxidación de lípidos encontrada coincide con Emiliano y cols., (2011) que describen, en las crías de madres que sufren SM, valores más elevados de MDA que en las controles.

En machos fructosa existe una oxidación proteica ($p < 0,05$) y no lipídica, a pesar de existir una elevada ratio GR/GPx. La ausencia de oxidación lipídica puede estar relacionada con el perfil lipídico en crías, el cual es diferente al de adultos (Ojeda y cols., 2008), encontrándose los lípidos mayoritariamente en las membranas, donde el incremento de GPx4 encontrado podría estar ejerciendo su acción beneficiosa.

De todo ello podemos concluir que la menor actividad SOD encontrada, en ambos grupos de crías, es determinante para la oxidación de proteínas hepáticas en crías machos y hembras de madres expuestas a fructosa. No ocurriendo así en madres, donde existe oxidación lipídica exclusivamente (Figura 5.2.3.3), probablemente por las diferencias en la composición lipídica entre adultos y crías.

La mayor oxidación lipídica encontrada en hembras podría estar relacionada con las alteraciones en los mecanismos antioxidantes compensatorios encontrados. Así, el Se, las selenoproteínas analizadas y la CAT, especialmente alteradas en las crías hembras, podrían estar desempeñando un papel importante en el EO hepático y en consecuencia, sobre el desarrollo del SM en este sexo.

5.7. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA AMPK TOTAL Y FOSFORILADA EN HÍGADO DE CRÍAS

La Figura 5.7 muestra como la expresión de la AMPK total no presenta diferencias significativas entre los grupos estudiados. Sin embargo, la expresión de la AMPK fosforilada (activa) así como la ratio p-AMPK/AMPKt están claramente disminuidas en las crías fructosa hembras, indicando una inactivación hepática de la AMPK que favorece la gluconeogénesis. Este resultado concuerda con la mayor expresión de Selp encontrada en estas crías. Lo que tiene relevancia, pues como ya se comentó, según diversos autores, los niveles de Selp son inversamente proporcionales a los de p-AMPK,

pues se inhiben recíprocamente (Steinbrenner 2013, Misu y cols., 2010, Jung y cols., 2014).

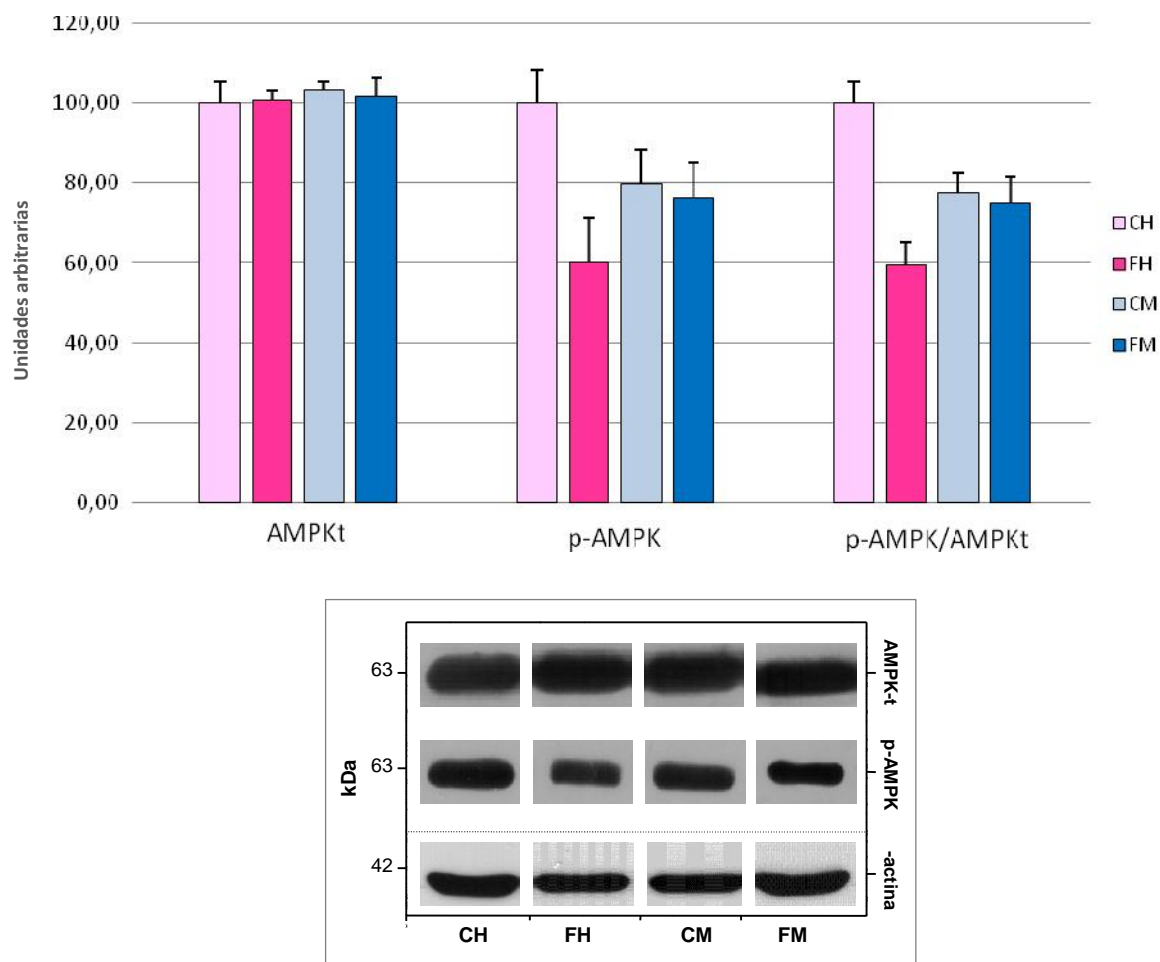


Figura 5.7. Expresión de la proteína AMPK total y fosforilada en hígado de crías de 21 días por sexos. Ratio. Los resultados son expresados como la media \pm ESM Grupos: control hembras CH, fructosa hembras FH, control machos CM y fructosa machos FM. N° de animales= 15/12/18/13. Significación: CH vs FH $p < 0,01$.

Recientemente, Mukai y cols. (2014) han encontrado que la ingesta materna de fructosa durante el embarazo modula la expresión hepática e hipotalámica de p-AMPK dependiendo del sexo de la cría. En concreto, al igual que nuestros datos, encontraron una disminución de la expresión de la p-AMPK hepática exclusivamente en crías hembras. Estos autores defienden que la ingesta materna de fructosa afecta más al metabolismo de los hidratos de carbono de las crías hembras, aunque aún no se conozca el mecanismo concreto por el que ocurre. Además sugieren que la RI que presentan estas

crías está íntimamente relacionada con el efecto de la fructosa sobre la acción de la insulina.

En este sentido, otros autores han encontrado claras diferencias entre los efectos que el consumo excesivo de fructosa por las madres durante la gestación y la lactancia, causa en las crías en función de su sexo. Siendo los efectos de este azúcar sobre el metabolismo más marcado en hembras que en machos a corto plazo (Vickers y cols., 2011, Sloboda y cols., 2014). En concreto, se ha observado que en fetos los niveles de leptina están elevados en hembras, y que estos cambios son paralelos a una reducción en el peso de sus placentas. Durante la lactancia los niveles de leptina se van igualando entre sexos.

Sin embargo, y contra todo pronóstico, parece ser que estos efectos son mayores en machos a largo plazo. En concreto, recientemente se ha observado en machos de 90 días, resistencia a la insulina y estrés oxidativo (Rodríguez y cols., 2015), y en machos de 261 días hiperinsulinemia e hipoadiponectinemia (Rodríguez y cols., 2016), no así en hembras. Quizás la respuesta adaptativa en un primer estadio de las hembras pueda actuar disminuyendo los efectos a largo plazo.

5.8. EXPRESIÓN DEL IRS-1 EN HÍGADO DE CRÍAS

La Figura 5.8.1 muestra la disminución en la expresión de la proteína IRS-1 hepática, en las hembras fructosa con respecto a las controles ($p<0,01$), así como en los machos fructosa ($p<0,05$).

Esta disminución del sustrato del receptor de insulina IRS-1 hepático podría ser una respuesta adaptativa a la drástica disminución de insulina sérica encontrada en estas crías, que es mayor en hembras (Tabla 5.3.2). Determinados estudios demuestran que IRS-1 se encuentra disminuido en individuos predispuestos a padecer DM2 y en individuos con bajo peso al nacer (Berends y cols., 2013), por lo que la expresión de IRS-1 podría ser un marcador de riesgo de diabetes.

En cualquier caso, en ratas adultas con SM desarrollado por el consumo de fructosa en agua, también se han encontrado niveles disminuidos de diferentes componentes que estimulan la cascada de señalización de la insulina, entre ellos el IRS-1 y un aumento de algunos inhibidores (Bettaieb y cols., 2014).

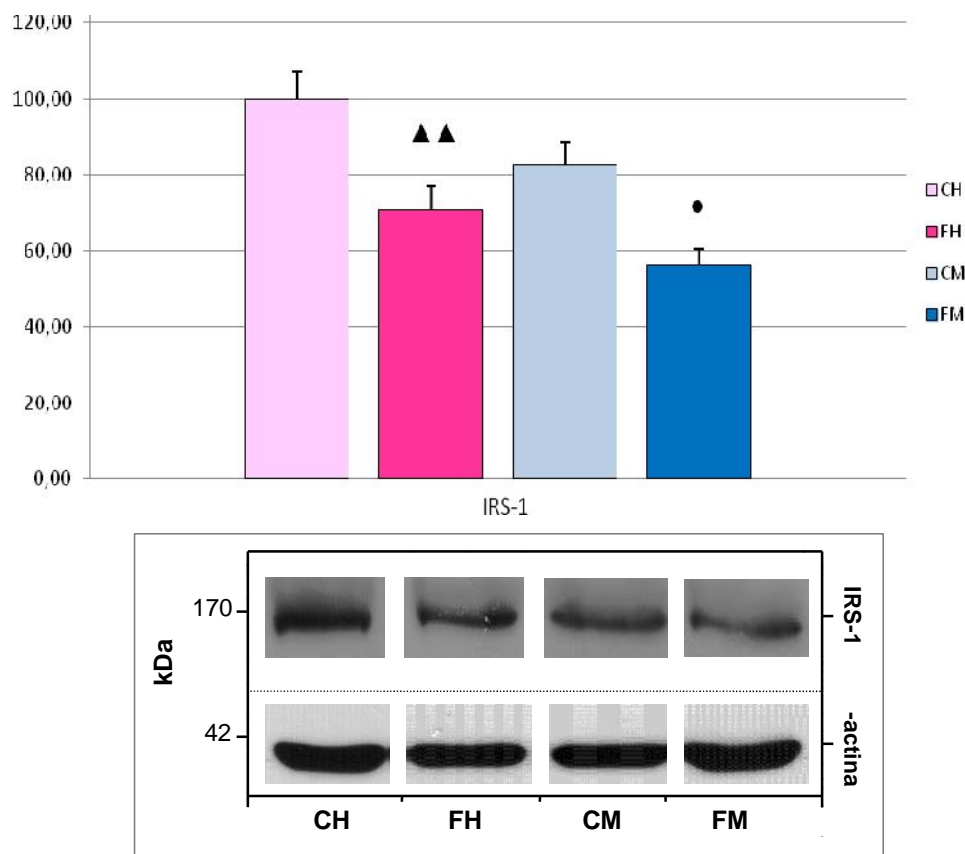


Figura 5.8.1. Expresión de proteína IRS-1 hepática de crías de 21 días. Los resultados son expresados como la media \pm ESM Grupos: control hembras CH, fructosa hembras FH, control machos CM y fructosa machos FM. N° de animales= 15/12/18/13. Significación: CH vs FH $p<0,01$; CM vs FM $p<0,05$.

A tenor de los resultados obtenidos, podemos concluir que el Se a través de la GPx1 y la SelP actúa a nivel hepático sobre la cascada de señalización de la glucosa, acelerando la aparición de RI. Esta regulación a la alza de las selenoproteínas analizadas son mucho más patentes en hembras, donde las alteraciones metabólicas son mayores que en machos, especialmente las relacionadas con la insulina.

Por todo ello, el posible mecanismo de acción que defiende esta Tesis es que el aumento de GPx1 disminuye el H_2O_2 necesaria para inhibir a PTEN y PTP1-B y favorecer la acción de la insulina; y que el aumento de SelP inhibe la acción del AMPK que al inhibir mTOR favorecería la fosforilación de IRS-1. Todo ello se puede observar en la de Figura 5.8.2.

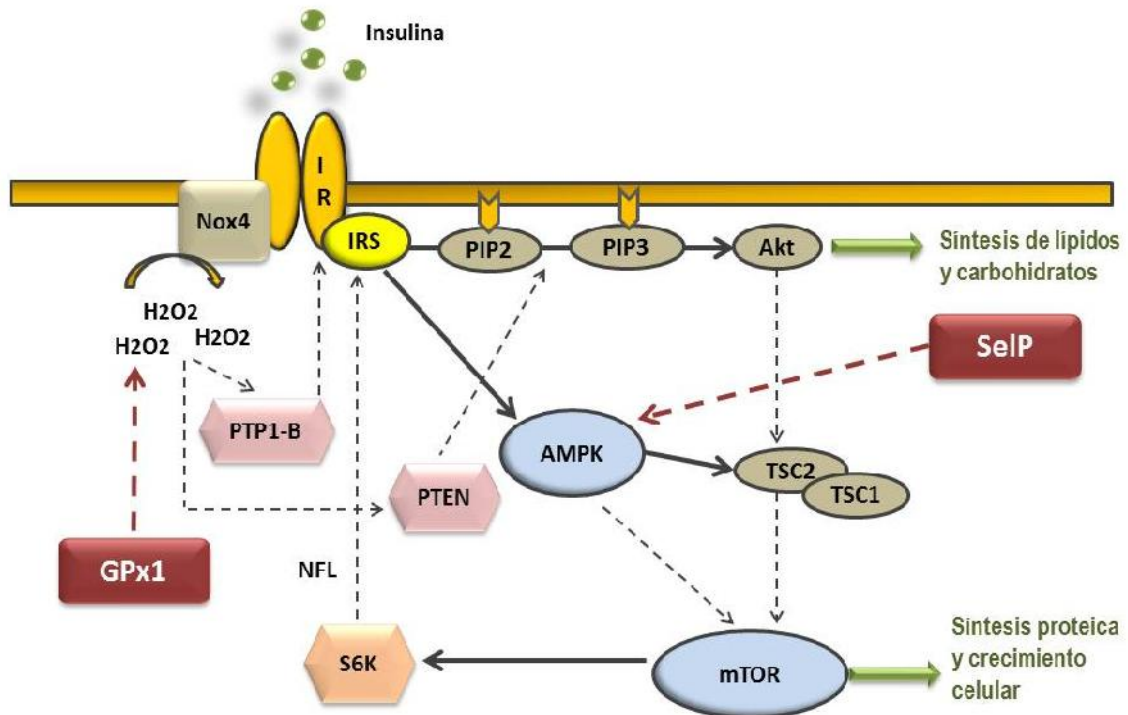


Figura 5.8.2. Acción propuesta de la GPx y SelP sobre la cascada de señalización de la insulina a tenor de los resultados obtenidos en esta Tesis. Ojeda ML.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

CONCLUSIÓN PRIMERA

Las madres lactantes del grupo fructosa presentaron los signos propios de la instauración del SM: hipoinsulinemia severa, hipertrigliceridemia, mala distribución corporal de grasas y aumento de la presión arterial media. Además, presentaron características propias del SM en esta etapa como una disminución de peso corporal y una fase crítica en la supervivencia de las crías en la primera semana de lactancia, todo ello unido a una hepatomegalia.

CONCLUSIÓN SEGUNDA

Los niveles de Se en suero de las madres lactantes del grupo fructosa fueron constantes aunque disminuyó la retención de este nutriente, provocando su depleción en corazón y músculo, y una repleción en riñón e hígado. Los niveles elevados de Se en hígado coincidieron con una mayor actividad de la enzima GPx, sin embargo el desbalance de enzimas antioxidantes encontrado dio lugar a la aparición de oxidación de los lípidos hepáticos. Así se ha constado que el hígado materno está sometido a EO concomitante al SM instaurado. La disminución de Se cardíaco debe ser analizada en mayor profundidad pues podría estar relacionada con las complicaciones cardiovasculares de esta patología.

CONCLUSIÓN TERCERA

Las crías expuestas a fructosa al nacer presentaron un alto IMC que disminuyó al final de la lactancia, especialmente en las crías machos, coincidente con una menor ingesta de leche. Por otro lado, las crías hembras presentaron cardiomegalia y hepatomegalia junto con una mayor disminución de insulina. Tanto las crías fructosa macho como las hembras, no alteraron sus niveles séricos de Se y mostraron depleción de este mineral en músculo, corazón y páncreas; y una repleción en el riñón. Las crías hembras, pero no los machos, presentaron un aumento de Se en hígado, a semejanza de las madres.

CONCLUSIÓN CUARTA

El estudio del EO hepático muestra diferencias relacionadas con el sexo entre los distintos grupos de crías:

Las **hembras fructosa** presentaron una mayor expresión de GPx1, GPx4 y SelP, coincidiendo con unos mayores niveles de Se en este tejido, un aumento de la actividad antioxidante de la GPx, y alta oxidación de lípidos y proteínas. Este aumento del EO hepático podría estar relacionado con la aparición de una mayor RI, como muestran sus bajos niveles de insulina séricos. Además el aumento de SelP encontrado parece disminuir el AMPK activado y con ello la cascada de señalización de la insulina, mostrando este género un mayor daño metabólico.

Los **machos fructosa** presentaron una mayor expresión de GPx4 aunque no existió repleción de Se en este tejido, ni hepatomegalia, ni disminución del p-AMPK, ni oxidación de lípidos; aunque las enzimas antioxidantes estuvieron alteradas y hubo oxidación de proteínas. Por todo ello, la disminución de insulina sérica y la disminución de IRS-1, fue menor que en las hembras. Así, se constata que existe una relación directa entre Se-selenoproteínas-metabolismo hepático que favorece la evolución del SM.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

A

- Abdulla MH, Sattar MA, Johns EJ. "The Relation between Fructose-Induced Metabolic Syndrome and Altered Renal Haemodynamic and Excretory Function in the Rat". *Int J Nephrol*. 2011.
- Abdulla MH, Sattar MA, Johns EJ, Abdullah NA, Hye Khan MA, Rathore HA. "High-fructose feeding impacts on the adrenergic control of renal haemodynamics in the rat". *Br J Nutr*. 2012; 107(2):218-28.
- Abdulla MH, Sattar MA, Abdullah NA, Johns EJ. "The effect of high-fructose intake on the vasopressor response to angiotensin II and adrenergic agonists in Sprague-Dawley rats". *Pak J Pharm Sci*. 2013; 26(4):727-32.
- Al-Lahham R, Deford JH, Papaconstantinou J. "Mitochondrial-generated ROS down regulates insulin signaling via activation of the p38MAPK stress response pathway". *Mol Cell Endocrinol*. 2016; 419:1-11.
- Alzamendi A, Giovambattista A, García ME, Rebolledo OR, Gagliardino JJ, Spinedi E. "Effect of pioglitazone on the fructose induced abdominal adipose tissue dysfunction". *PPAR Res*. 2012.
- Andoh A, Hirashima M, Maeda H, Hata K, Inatomi O, Tsujikawa T, Sasaki M, Takahashi K, Fujiyama Y. "Serum selenoprotein-P levels in patients with inflammatory bowel disease". *Nutrition*. 2005; 21(5):574-9.
- Apaijai N, Pintana H, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. "Cardioprotective effects of metformin and vildagliptin in adult rats with insulin resistance induced by a high-fat diet". *Endocrinology*. 2012; 153(8):3878-85.
- Armutcu F, Ataymen M, Atmaca H, Gurel A. "Oxidative stress markers, C-reactive protein and heat shock protein 70 levels in subjects with metabolic syndrome". *Clin Chem Lab Med*. 2008;46(6):785-90.
- Arnaud J, de Lorgeril M, Akbaraly T, Salen P, Arnout J, Cappuccio FP, van Dongen MC, Donati MB, Krogh V, Siani A, Iacoviello L; European Collaborative Group of the IMMIDIET Project. "Gender differences in copper, zinc and selenium status in diabetic-free metabolic syndrome European population - the IMMIDIET study". *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2012; 22(6):517-24.
- Ayaz M, Turan B. Selenium prevents diabetes-induced alterations in [Zn²⁺]_i and metallothionein level of rat heart via restoration of cell redox cycle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006; 290(3):H1071-80.

B

- Barnes KM, Evenson JK, Raines AM, Sunde RA. "Transcript analysis of the selenoproteome indicates that dietary selenium requirements of rats based on selenium-regulated selenoprotein mRNA levels are uniformly less than those based on glutathione peroxidase activity". *J Nutr*. 2009; 139(2):199-206.

- Barone S, Fussell SL, Singh AKm y cols., "Slc2a5 (Glut5) is essential for the absorption of fructose in the intestine and generation of fructose-induced hypertension". *J. Biol. Chem.* 2009; 284(8):5056–66.
- Basciano H, Federico L, Adeli K. "Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia". *Nutr Metab (Lond)*. 2005; 2:5.
- Battin EE, Brumaghim JL. "Antioxidant activity of sulfur and selenium: a review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase, and metal-binding antioxidant mechanisms". *Cell Biochem Biophys*. 2009; 55: 1-23.
- Bel Comós J, Murillo Valles M. "Obesidad y síndrome metabólico". *Protoc diagn ter pediatr*. 2011; 1:228-35
- Benito de las Heras, MR. "Patologías asociadas a la obesidad. Síndrome metabólico y diabetes mellitus tipo 2." *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 2014.
- Benstoem C, Goetzenich A, Kraemer S, Borosch S, Manzanares W, Hardy G, Stoppe C. "Selenium and its supplementation in cardiovascular disease--what do we know?" *Nutrients*. 2015; 7(5):3094-118.
- Berends LM, Fernandez-Twinn DS, Martin-Gronert MS, Cripps RL, Ozanne SE. "Catch-up growth following intra-uterine growth-restriction programmes an insulin-resistant phenotype in adipose tissue." *Int J Obes (Lond)*. 2013; 37(8):1051-7.
- Bettaieb A, Vazquez Prieto MA, Rodriguez Lanzi C, Miatello RM, Haj FG, Fraga CG, Oteiza PI. "(-)-Epicatechin mitigates high-fructose-associated insulin resistance by modulating redox signaling and endoplasmic reticulum stress". *Free Radic Biol Med*. 2014; 72:247-56
- Bloch-Damti A, Bashan N. "Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress". *Antioxid Redox Signal*. 2005; 7(11-12):1553-67.
- Bonomini F, Rodella LF, Rezzani R. "Metabolic syndrome, aging and involvement of oxidative stress." *Aging Dis*. 2015; 6(2):109-20.
- Boura-Halfon S, Zick Y. "Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance". *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009; 296(4):E581-91.
- Bouزيد MA, Filaire E, McCall A, Fabre C. "Radical Oxygen Species, Exercise and Aging: An Update". *Sports Med*. 2015; 45(9):1245-61.
- Bozkurt O, Haman Bayari S, Severcan M, Krafft C, Popp J, Severcan F. "Structural alterations in rat liver proteins due to streptozotocin-induced diabetes and the recovery effect of selenium:Fourieres transform infrared microspectroscopy and neural network study". *J Biomed Opt*. 2012.
- Brambilla P, Pietrobelli A. "Behind and beyond the pediatric metabolic síndrome". *Ital J Pediatr*. 2009; 35:41.

- Brigelius-Flohé R. "Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases". *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 951–965.
- Brigelius-Flohé R, Maiorino M. "Glutathione peroxidases". *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1830(5):3289-303.
- Brozmanová J, Mániková D, Vlčková V, Chovanec M. "Selenium: a double-edged sword for defense and offence in cancer". *Arch Toxicol*. 2010; 84(12):919-38.
- Burk RF, Hill KE. "Selenoprotein P: an extracellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis". *Annu Rev Nutr*. 2005; 25:215-35.

C

- Camargo A, Peña-Orihuela P, Rangel-Zúñiga OA, Pérez-Martínez P, Delgado-Lista J, Cruz-Teno C, Marín C, Tinahones F, Malagón MM, Roche HM, Pérez-Jiménez F, López-Miranda J. "Peripheral blood mononuclear cells as in vivo model for dietary intervention induced systemic oxidative stress". *Food Chem Toxicol*. 2014; 72:178-86.
- Carmona A, Freedland RA. "Comparison among the lipogenic potential of various substrates in rat hepatocytes: the differential effects of fructose-containing diets on hepatic lipogenesis". *J Nutr*. 1989; 119(9):1304-10.
- Carreras O, Ojeda ML, Nogales F. Selenium Dietary Supplementation and Oxidative Balance in Alcoholism. In: Vinood BP, ed. "Molecular Aspects of Alcohol and Nutrition". 2015; Elsevier. Pag. 133-139.
- Ceriello A, Motz E. "Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited". *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004; 24(5):816-23.
- Chen CY, Crott J, Liu Z, Smith DE. "Fructose and saturated fats predispose hyperinsulinemia in lean male rat offspring". *Eur J Nutr*. 2010; 49(6):337-43.
- Chen J. "An original discovery: selenium deficiency and Keshan disease (an endemic heart disease)". *Asia Pac J Clin Nutr*. 2012; 21(3):320-6.
- Cheng SM, Cheng YJ, Wu LY, Kuo CH, Lee YS, Wu MC, Huang CY, Ting H, Lee SD. "Activated apoptotic and anti-survival effects on rat hearts with fructose induced metabolic syndrome". *Cell Biochem Funct*. 2014; 32(2):133-41.
- Choi K, Kim YB. "Molecular mechanism of insulin resistance in obesity and type 2 diabetes". *Korean J Intern Med*. 2010; 25(2):119-29.
- Combs GF Jr. "Biomarkers of selenium status. *Nutrients*". 2015; 7(4):2209-36.
- Crosley LK, Bashir S, Nicol F, Arthur JR, Hesketh JE, Sneddon AA. "The single-nucleotide polymorphism (GPX4c718t) in the glutathione peroxidase 4 gene influences endothelial cell function: interaction with selenium and fatty acids". *Mol Nutr Food Res*. 2013; 57(12):2185-94.
- Czerska M, Mikołajewska K, Zieliński M, Gromadzińska J, Wsowicz W. "Today's oxidative stress markers". *Med Pr*. 2015; 66(3):393-405.

D

- Dabelea, D.; Crume, T. "Maternal environment and the transgenerational cycle of obesity and diabetes". *Diabetes*, 2011; 60(7), 1849- 55.
- Daniels LA. "Selenium metabolism and bioavailability". *Biol Trace Elem Res*. 1996; 54(3):185-99.
- Davi G, Falco A, Patrono C. "Lipid peroxidation in diabetes mellitus". *Antioxid Redox Signal*, 2005; 7:256-258.
- Day C. "Metabolic syndrome, or What you will: definitions and epidemiology". *Diab Vasc Dis Res*. 2007; 4(1):32-8
- Dekker MJ, Su Q, Baker C, Rutledge AC, Adeli K. "Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and the metabolic syndrome" *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010; 299: E685–94.
- Delbosc S, Paizanis E, Magous R, Araiz C, Dimo T, Cristol JP, Cros G, Azay J. "Involvement of oxidative stress and NADPH oxidase activation in the development of cardiovascular complications in a model of insulin resistance, the fructose-fed rat". *Atherosclerosis*. 2005; 179(1):43-9.
- de Oliveira J, Hort MA, Moreira EL, Glaser V, Ribeiro-do-Valle RM, Prediger RD et al. (2011). "Positive correlation between elevated plasma cholesterol levels and cognitive impairments in LDL receptor knockout mice: relevance of cortico-cerebral mitochondrial dysfunction and oxidative stress". *Neuroscience*, 2011; 197:99106
- Dodig S, Cepelak I. "The facts and controversies about selenium". *Acta Pharm*. 2004; 54(4):261-76.
- Draper HH, Hadley M. "Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation". *Methods Enzymol* 1990; 186:421-31.

E

- Elnakish MT, Hassanain HH, Janssen PM, Angelos MG, Khan M. "Emerging role of oxidative stress in metabolic syndrome and cardiovascular diseases: important role of Rac/NADPH oxidase". *J Pathol*. 2013; 231(3):290-300.
- Emiliano AF, de Cavalho LC, da Silva Cristino Cordeiro V, da Costa CA, de Oliveira PB, Queiroz EF, Col Moreira DD, Boaventura GT, de Moura RS, Resende AC. "Metabolic disorders and oxidative stress programming in offspring of rats fed a high-fat diet during lactation: effects of a vinifera grape skin (ACH09) extract". *J Cardiovasc Pharmacol*. 2011; 58(3):319-28.
- Esfahani M, Movahedian A, Baranchi M, Goodarzi MT. "Adiponectin:an adipokine with protective features against metabolic syndrome". *Iran J Basic Med Sci*. 2015; 18(5):430-42.

F

- Faeh D, Minehira K, Schwarz JM, Periasamy R, Park S, Tappy L. "Effect of fructose overfeeding and fish oil administration on hepatic de novo lipogenesis and insulin sensitivity in healthy men". *Diabetes*. 2005; 54(7):1907-13.
- Feoli AM, Macagnan FE, Piovesan CH, Bodanese LC, Siqueira IR. "Xanthine oxidase activity is associated with risk factors for cardiovascular disease and inflammatory and oxidative status markers in metabolic syndrome: effects of a single exercise session". *Oxid Med Cell Longev*. 2014; 2014:587083.
- Fernández-Bergé D, Cabrera de León A, Sanz H, Elosua R, Guembe MJ, Alzamora M, Vega-Alonso T, Félix-Redondo FJ, Ortiz-Marrón H, Rigo F, Lama C, Gavrila D, Segura-Fragoso A, Lozano L y Marrugat J "Síndrome metabólico en España: prevalencia y riesgo coronario asociado a la definición armonizada y a la propuesta por la OMS. Estudio DARIOS" *Rev Esp Cardiol*. 2012; 65(3):241–248
- Foretz M, Taleux N, Guigas B, Horman S, Beauloye C, Andreelli F, Bertrand L, Viollet B. "Regulation of energy metabolism by AMPK: a novel therapeutic approach for the treatment of metabolic and cardiovascular diseases". *Med Sci (Paris)*. 2006; 22(4):381-8.
- Fortuño A, San José G, Moreno MU, Beloqui O, Díez J, Zalba G. "Phagocytic NADPH oxidase overactivity underlies oxidative stress in metabolic syndrome". *Diabetes*. 2006; 55(1):209-15.
- Fowden AL, Forhead AJ. "Endocrine mechanisms of intrauterine programming" *Reproduction*. 2004; 127(5):515-26.
- Fridovich I. "Cytochrome C". In: Greenwald RA, ed. "Handbook of methods for oxygen radical research". Boca Raton, FL: CRC Press 1985; 213-5.
- Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y et al. "Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome". *J Clin Invest*, 2004; 114:1752–1761.

G

- Gallo C, Renzi P, Loizzo S, Loizzo A, Piacente S, Festa M, Caputo M, Tecce MF, Capasso A. "Potential therapeutic effects of vitamin e and C on placental oxidative stress induced by nicotine: an in vitro evidence". *Open Biochem J*. 2010; 24(4):77-82.
- García-Fuentes E., Garrido-Sánchez L., Tinahones F.J.. "Homeostatic Model Assessment (HOMA). Practical considerations" *Av. Diabetol*. 2008; 24(4):291-295
- Ghazi Harsini S, Habibiyan M, Moeini MM, Abdolmohammadi AR. "Effects of dietary selenium, vitamin E, and their combination on growth, serum metabolites, and antioxidant defense system in skeletal muscle of broilers under heat stress". *Biol Trace Elem Res*. 2012; 148(3):322-30.

- Giacca A, Xiao C, Oprescu AI, Carpentier AC, Lewis GF. "Lipid-induced pancreatic β -cell dysfunction: focus on in vivo studies". *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2011; 300: E255–E262.
- Giacco F, Brownlee M. "Oxidative stress and diabetic complications". *Circ Res*. 2010; 107(9):1058-70.
- Godfrey KM, Barker DJ. "Fetal nutrition and adult disease". *Am J Clin Nutr*. 2000; 71(5 Suppl):1344S-52S.
- Gómez-Amores L, Mate A, Miguel-Carrasco JL, Jiménez L, Jos A, Cameán AM, Revilla E, Santa-María C, Vázquez CM. "L-carnitine attenuates oxidative stress in hypertensive rats". *J Nutr Biochem*. 2007; 18:533-40.
- González J, Valls N, Brito R, Rodrigo R. "Essential hypertension and oxidative stress: New insights". *World J Cardiol*. 2014; 6(6):353-66.
- González-Bulnes A, Ovilo C y Astiz S. "Transgenerational Inheritance in the Offspring of Pregnant Women with Metabolic Syndrome" *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2014; 15, 13-23.
- Goodman E, Daniels SR, Meigs JB, Dolan LM. "Instability in the diagnosis of metabolic syndrome in adolescents". *Circulation*. 2007; 115(17):2316-22.
- Grankvist K, Marklund SL, Taljedal IB. "CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse". *Biochem J*, 1981; 199: 393–398.
- Grinberg P, Gonçalves RA, de Campos RC. "The determination of total Se in urine and serum by graphite furnace atomic absorption spectrometry using Ir as permanent modifier and in situ oxidation for complete trimethylselenonium recovery". *Anal Bioanal Chem*. 2005; 383(7-8):1044-51.
- Gual P, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF. "Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation". *Biochimie*. 2005; 87: 99-109.
- Guallar-Castillón P, Francisco Pérez R, López García E, León-Muñoz LM, Aguilera MT, Graciani A, Gutiérrez-Fisac JL, Banegas JR, Rodríguez-Artalejo F. "Magnitud y manejo del síndrome metabólico en España en 2008-2010: Estudio ENRICA" *Revista Española de Cardiología*, Volume 67, Issue 5, 2014; Pages 367-373.
- Guo, S. "Insulin signaling, resistance, and metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms". *Journal of Endocrinology* 220.2 2014; T1-T23.
- H**
- Hu X, Wang M, Bei W, Han Z, Guo J. "The Chinese herbal medicine FTZ attenuates insulin resistance via IRS1 and PI3K in vitro and in rats with metabolic syndrome". *J Transl Med*. 2014; 12:47.
- Hurtado V, Roncero I, Blazquez E, Alvarez E, Sanz C. "Glucagon-Like Peptide-1 and Its Implications in Obesity, Hot Topics in Endocrine and Endocrine-Related Diseases", 2013; Dr. Monica Fedele (Ed.), ISBN: 978-953-51-1080-4

I

Ishikura K, Misu H, Kumazaki M, Takayama H, Matsuzawa-Nagata N, Tajima N, Chikamoto K, Lan F, Ando H, Ota T, Sakurai M, Takeshita Y, Kato K, Fujimura A, Miyamoto K, Saito Y, Kameo S, Okamoto Y, Takuwa Y, Takahashi K, Kidoya H, Takakura N, Kaneko S, Takamura T. "Selenoprotein P as a diabetes-associated hepatokine that impairs angiogenesis by inducing VEGF resistance in vascular endothelial cells". *Diabetologia*. 2014; 57(9):1968-76.

Iwakami S., Misu H., Takeda T., Sugimori M., Matsugo S., Kaneko S., and Takamura T. "Concentration-dependent dual effects of hydrogen peroxide on insulin signal transduction in H4IIEC hepatocytes". *PLoS One* 6: e27401, 2011.

J

Jia G, Aroor AR, Whaley-Connell AT, Sowers JR. "Fructose and uric acid: is there a role in endothelial function?". *Curr Hypertens Rep*. 2014; 16(6):434.

Johnson RJ, Pérez-Pozo SE, Sautin YY, et al. "Hypothesis: Could Excessive Fructose Intake and Uric Acid Cause Type 2 Diabetes?" *Endocrine Reviews*. 2009; 30(1):96-116.

Johnson RJ, Segal MS, Sautin Y, Nakagawa T, Feig DI, Kang DH, Gersch MS, Benner S, Sánchez-Lozada LG "Potential role of sugar (fructose) in the epidemic of hypertension, obesity and the metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and cardiovascular disease". *Am J Clin Nutr*. 2007; 86: 899–906.

Johnson RJ, Nakagawa T, Sanchez-Lozada LG, Shafiu M, Sundaram S, Le M, Ishimoto T, Sautin YY, Lanaspa MA. "Sugar, uric acid, and the etiology of diabetes and obesity". *Diabetes*. 2013; 62(10):3307-15.

Jotty K, Ojeda ML, Nogales F, Rubio JM, Murillo ML, Carreras O. "Selenium tissue distribution changes after ethanol exposure during gestation and lactation: selenite as a therapy". *Food Chem Toxicol*. 2009; 47(10):2484-9.

Jotty K, Ojeda ML, Nogales F, Murillo ML, Carreras O. "Selenium dietary supplementation as a mechanism to restore hepatic selenoprotein regulation in rat pups exposed to alcohol". *Alcohol*. 2013; 47(7):545-52

Jung TW, Lee SY, Hong HC, Choi HY, Yoo HJ, Baik SH, Choi KM. "AMPK activator-mediated inhibition of endoplasmic reticulum stress ameliorates carrageenan-induced insulin resistance through the suppression of selenoprotein P in HepG2 hepatocytes". *Mol Cell Endocrinol*. 2014; 382(1):66-73.

K

Kalra B, Gupta Y, Kalra S. "Breast feeding: preventive therapy for type 2 diabetes". *J Pak Med Assoc*. 2015; 65(10):1134-6.

Kamigaki M, Sakaue S, Tsujino I, Ohira H, Ikeda D, Itoh N, Ishimaru S, Ohtsuka Y, Nishimura M.

"Oxidative stress provokes atherogenic changes in adipokine gene expression in 3T3-L1 adipocytes". *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 339(2):624-32.

- Katunga LA, Gudimella P, Efird JT, Abernathy S, Mattox TA, Beatty C, Darden TM, Thayne KA, Alwair H, Kypson AP, Virag JA, Anderson EJ. "Obesity in a model of gpx4 haploinsufficiency uncovers a causal role for lipid-derived aldehydes in human metabolic disease and cardiomyopathy". *Mol Metab.* 2015; 4(6):493-506.
- Keaney JF Jr, Larson MG, Vasan RS, Wilson PW, Lipinska I, Corey D, Massaro JM, Sutherland P, Vita JA, Benjamin EJ; Framingham Study. "Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study". *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23(3):434-9.
- Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG. "AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism". *Cell Metab.* 2005; 1:15-25.
- Khanam R, Pillai KK. "Effect of chromium picolinate on modified forced swimming test in diabetic rats: involvement of serotonergic pathways and potassium channels". *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2006; 98(2):155-9.
- Khitan Z, Kim DH. "Fructose: a key factor in the development of metabolic syndrome and hypertension". *J Nutr Metab.* 2013; 2013:682673.
- Kilpatrick ES, Rigby AS, Atkin SL. "Insulin resistance, the metabolic syndrome, and complications risk in type 1 diabetes: "double diabetes" in the Diabetes Complications Trial". *Diabetes Care.* 2007; 30: 707-712.
- Kim B, Feldman EL. "Insulin resistance as a key link for the increased risk of cognitive impairment in the metabolic syndrome". *Exp Mol Med.* 2015; 47:e149.
- Kim HY, Okubo T, Juneja LR, Yokozawa T. "The protective role of amla (*Embolica officinalis* Gaertn.) against fructose-induced metabolic syndrome in a rat model". *Br J Nutr.* 2010; 103(4):502-12.
- Kitagawa A, Ohta Y, Ohashi K. "Melatonin improves metabolic syndrome induced by high fructose intake in rat" *J Pineal Res.* 2012; 52(4):403-13.
- Kljai K, Runje R. "Selenium and glycogen levels in diabetic patients". *Biol Trace Elem Res.* 2001; 83(3):223-9.
- Kottronen A, Westerbacka J, Bergholm R, Pietiläinen KH, Yki-Jarvinen H. "Liver fat in the metabolic syndrome". *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92:3490–7.
- Koulajian K, Ilovic A, Ye K, Desai T, Shah A, Fantus IG, Ran Q, Giacca A. "Overexpression of glutathione peroxidase 4 prevents β -cell dysfunction induced by prolonged elevation of lipids in vivo." *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013; 305(2):E254-62.
- L**
- Labunskyy VM, Lee BC, Handy DE, Loscalzo J, Hatfield DL, Gladyshev VN. "Both maximal expression of selenoproteins and selenoprotein deficiency can promote

- development of type 2 diabetes-like phenotype in mice". *Antioxid Redox Signal*. 2011; 14(12):2327-36.
- Laemmli UK. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature*. 1970; 227(5259):680-5.
- Lassègue B, Griendling KK. "Reactive oxygen species in hypertension; An update". *Am J Hypertens*. 2004; 17(9):852-60.
- Lawrence RA, Burk RF. "Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver". *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 71:952-8.
- Lê KA, Faeh D, Stettler R, Ith M, Kreis R, Vermathen P, Boesch C, Ravussin E, Tappy L. "A 4-wk high-fructose diet alters lipid metabolism without affecting insulin sensitivity or ectopic lipids in healthy humans". *Am J Clin Nutr*. 2006; 84(6):1374-9.
- Lenzen S, Drinkgern J, Tiedge M. "Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues". *Free Radic Biol Med*, 1996; 20: 463–466.
- Liang H, Yoo SE, Na R, Walter CA, Richardson A, Ran Q. "Short form glutathione peroxidase 4 is the essential isoform required for survival and somatic mitochondrial functions". *J Biol Chem*. 2009; 284(45):30836-44.
- Loh K, Deng H, Fukushima A, Cai X, Boivin B, Galic S, Bruce C, Shields BJ, Skiba B, Ooms LM, Stepto N, Wu B, Mitchell CA, Tonks NK, Watt MJ, Febbraio MA, Crack PJ, Andrikopoulos S, Tiganis T. "Reactive oxygen species enhance insulin sensitivity". *Cell Metab*. 2009;10(4):260-72.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. "Protein measurement with Folin phenol reagent". *J Biol Chem* 1951;1:265-75.
- Lugogo NL, Bappanad D, Kraft M. "Obesity, metabolic dysregulation and oxidative stress in asthma". *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1810(11):1120-6.
- Lushchak VI. "Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification". *Chem Biol Interact*. 2014; 224C:164-175.

M

- Magnussen CG, Koskinen J, Chen W, Thomson R, Schmidt MD, Srinivasan SR, Kivimäki M, Mattsson N, Kähönen M, Laitinen T, Taittonen L, Rönnekaa T, Viikari JS, Berenson GS, Juonala M, Raitakari OT. "Pediatric metabolic syndrome predicts adulthood metabolic syndrome, subclinical atherosclerosis, and type 2 diabetes mellitus but is no better than body mass index alone: the Bogalusa Heart Study and the Cardiovascular Risk in Young Finns Study". *Circulation*. 2010; 122(16):160411.
- Mahadev K, Zilbering A, Zhu L, Goldstein BJ. "Insulin-stimulated hydrogen peroxide reversibly inhibits protein-tyrosine phosphatase 1b in vivo and enhances the early insulin action cascade". *J Biol Chem*. 2001; 276(24):21938-42.

- Malek A. "The Impact of Metabolic Disease Associated with Metabolic Syndrome on Human Pregnancy" *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2014; 15, 3-12.
- Marques de Mattos A, Marino LV, Ovidio PP, Jordão AA, Almeida CC, Chiarello PG (2012). "Protein oxidative stress and dyslipidemia in dialysis patients". *Ther Apher Dial*, 2012; 16:68-74.
- Marriott BP, Cole N, Lee E. "National estimates of dietary fructose intake increased from 1977 to 2004 in the United States". *J Nutr*. 2009; 139(6):1228S-1235S.
- Maulik N., Das D.K. Emerging potential of thioredoxin and thioredoxin interacting proteins in various disease conditions. *Biochim. Biophys. Acta*. 2008; 1780:1368–1382.
- McClung JP, Roneker CA, Mu W, Lisk DJ, Langlais P, Liu F, Lei XG. "Development of insulin resistance and obesity in mice overexpressing cellular glutathione peroxidase". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(24):8852-7.
- Meshkani R, Adeli K. "Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease". *Clin Biochem*. 2009; 42(13-14):1331-46.
- Metes-Kosik N, Luptak I, Dibello PM, Handy DE, Tang SS, Zhi H, Qin F, Jacobsen DW, Loscalzo J, Joseph J. "Both selenium deficiency and modest selenium supplementation lead to myocardial fibrosis in mice via effects on redox-methylation balance". *Mol Nutr Food Res*. 2012; 56(12):1812-24.
- Misu H, Takamura T, Takayama H, Hayashi H, Matsuzawa-Nagata N, Kurita S, Ishikura K, Ando H, Takeshita Y, Ota T, Sakurai M, Yamashita T, Mizukoshi E, Yamashita T, Honda M, Miyamoto K, Kubota T, Kubota N, Kadowaki T, Kim HJ, Lee IK, Minokoshi Y, Saito Y, Takahashi K, Yamada Y, Takakura N, Kaneko S. "A liver-derived secretory protein, SelP, causes insulin resistance". *Cell Metab*. 2010; 12:483-95.
- Mobasher MA, de Toro-Martín J, González-Rodríguez Á, Ramos S, Letzig LG, James LP, Muntané J, Álvarez C, Valverde ÁM. "Essential role of protein-tyrosine phosphatase 1B in the modulation of insulin signaling by acetaminophen in hepatocytes". *J Biol Chem*. 2014; 289(42):29406-19.
- Monnier L, Mas E, Ginet C, Michel F, Villon L, Cristol J-P et al.. Activation of oxidative stress by acute glucose fluctuations compared with sustained chronic hyperglycemia in patients with type 2 diabetes". *JAMA*, 2006; 295:1681-1687.
- Morrison JA, Ford ES, Steinberger J. "The pediatric metabolic síndrome". *Minerva Med*. 2008; 99(3):269-87.
- Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ. "A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in humans by non-cyclooxygenase free radical-catalyzed mechanism". *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; 87:9383-9387.
- Moschos MP. "Selenoprotein P". *Cell Mol Life Sci*. 2000; 57(13-14):1836-45.

Mukai Y, Kumazawa M, Sato S. "Fructose intake during pregnancy up-regulates the expression of maternal and fetal hepatic sterol regulatory element-binding protein-1c in rats". *Endocrine*. 2012.

Mukai Y, Ozaki H, Serita Y, Sato S. "Maternal fructose intake during pregnancy modulates hepatic and hypothalamic AMP-activated protein kinase signalling in a sex-specific manner in offspring". *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2014; 41(5):331-7.

Muntoni S. "Insulin resistance: pathophysiology and rationale for treatment". *Ann Nutr Metab*, 2011; 58: 25-36.

N

Naziroglu M, Cay M. "Protective role of intraperitoneally administered vitamin E and selenium on the antioxidative defense mechanism in rats with diabetes induced streptozotocin". *Biol Trace Elem Res*. 2001; 79:149-59

Negro R. "Selenium and thyroid autoimmunity". *Biologics*. 2008; 2(2): 265-73.

Nogales F, Ojeda ML, Fenutría M, Murillo ML, Carreras O. "Role of selenium and glutathione peroxidase on development, growth, and oxidative balance in rat offspring". *Reproduction*. 2013;146(6):659-67.

O

Ojeda ML, Delgado-Villa MJ, Llopis R, Murillo ML, Carreras O. "Lipid metabolism in ethanol-treated rat pups and adults: effects of folic Acid". *Alcohol Alcohol*. 2008; 43(5):544-50.

Ojeda ML, Nogales F, Vázquez B, Delgado MJ, Murillo ML, Carreras O. "Alcohol, gestation and breastfeeding: selenium as an antioxidant therapy". *Alcohol Alcohol*. 2009a; 44(3):272-7.

Ojeda ML, Nogales F, Jotty K, Barrero MJ, Murillo ML, Carreras O. "Dietary selenium plus folic acid as an antioxidant therapy for ethanol-exposed pups". *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 2009b; 86(6):490-5.

Ojeda ML, Nogales F, Murillo ML, Carreras O. "Selenium or selenium plus folic acid-supplemented diets ameliorate renal oxidation in ethanol-exposed pups". *Alcohol Clin Exp Res*. 2012; 36(11):1863-72.

P

Papp LV, Lu J, Holmgren A, Khanna KK. "From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health". *Antioxid Redox Signal*. 2007; 9(7): 775-806.

Pappas AC, Zoidis E, Surai PF, Zervas G. "Selenoproteins and maternal nutrition". *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2008; 151(4):361-72.

Park JH, Kho MC, Kim HY, Ahn YM, Lee YJ, Kang DG, Lee HS. "Blackcurrant Suppresses Metabolic Syndrome Induced by High-Fructose Diet in Rats". *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015; 2015:385976.

Patel MS, Srinivasan M. "Metabolic programming in the immediate postnatal life". *Ann Nutr Metab*. 2011; 58 Suppl 2:18-28.

- Peng FC, Tang SH, Huang MC, Chen CC, Kuo TL, Yin SJ. "Oxidative status in patients with alcohol dependence: a clinical study in Taiwan". *J Toxicol Environ Health A*. 2005; 68(17-18): 1497-1509.
- Petersen KF, Shulman GI. "Etiology of insulin resistance". *Am J Med*. 2006; 119(5 Suppl 1):S10-6.
- Pi J., Zhang Q., Fu J., Woods CG., Hou Y., Corkey BE., Collins S., and Andersen ME. "ROS signaling, oxidative stress and Nrf2 in pancreatic beta-cell function". *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009; 244: 77–83.
- Pizent A, Pavlovic M, Jurasovic J, Dodig S, Pasalic D, Mujagic R. "Antioxidants, trace elements and metabolic syndrome in elderly subjects". *J Nutr Health Aging*. 2010; 14(10):866-71.
- Poveda E, Trujillo P, Ruiz F, López E. " [Glucose and insulin levels in Wistar rats submitted to high fat diet and treatment with mimetic leptin peptides]. *Biomedica*. 2008; 28(1):50-63.

R

- Rajamohan F, Reyes AR, Frisbie RK, Hoth LR, Sahasrabudhe P, Magyar R, Landro JA, Withka JM, Caspers NL, Calabrese MF, Ward J, Kurumbail RG. "Probing the Enzyme Kinetics, Allosteric Modulation and Activation of Alpha-1 and Alpha-2 Subunit Containing AMP-activated Protein Kinase (AMPK) Heterotrimeric Complexes by Pharmacological and Physiological Activators". *Biochem J*. 2015. pii: BJ20151051.
- Rayman MP, Blundell-Pound G, Pastor-Barriuso R, Guallar E, Steinbrenner H, Stranges S. "A randomized trial of selenium supplementation and risk of type-2 diabetes, as assessed by plasma adiponectin". *PLoS One*. 2012; 7(9):e45269.
- Reddi AS, Bollineni JS. "Selenium-deficient diet induces renal oxidative stress and injury via TGF-beta1 in normal and diabetic rats". *Kidney Int*. 2001; 59(4):1342-53.
- Reeves MA, Hoffmann PR. "The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation". *Cell Mol Life Sci*. 2009; 66(15):2457-78.
- Reznick AZ, Packer L. "Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay". *Methods Enzymol* 1994; 233:357-63.
- Rkhezay-Jaf J, O'Dowd JF, Stocker CJ. "Maternal Obesity and the Fetal Origins of the Metabolic Syndrome". *Curr Cardiovasc Risk Rep*. 2012; 6(5):487-95.
- Roberts LJ, Morrow JD. "Measurement of F (2) isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo". *Free Radic Bio Med*, 2000; 28:505-513.
- Rodríguez L, Otero P, Panadero MI, Rodrigo S, Álvarez-Millán JJ, Bocos C. "Maternal fructose intake induces insulin resistance and oxidative stress in male, but not female, offspring". *J Nutr Metab*. 2015; 2015:158091.
- Rodríguez L, Panadero MI, Roglans N, Otero P, Rodrigo S, Álvarez-Millán JJ, Laguna JC, Bocos C. "Fructose only in pregnancy provokes hyperinsulinemia,

hypoadiponectinemia, and impaired insulin signaling in adult male, but not female, progeny". *Eur J Nutr.* 2016; 55:665-74.

Ruderman NB, Carling D, Prentki M, Cacicedo JM. "AMPK, insulin resistance, and the metabolic syndrome" *J Clin Invest.* 2013; 123(7): 2764–2772.

Rupérez AI, Olza J, Gil-Campos M, Leis R, Mesa MD, Tojo R, Cañete R, Gil Á, Aguilera CM. "Association of genetic polymorphisms for glutathione peroxidase genes with obesity in Spanish children". *J Nutrigenet Nutrigenomics.* 2014; 7(3):130-42.

S

Sahaf B, Heydari K, Herzenberg LA, Herzenberg LA. "The extracellular microenvironment plays a key role in regulating the redox status of cell surface proteins in HIV-infected subjects". *Arch Biochem Biophys.* 2005; 434:26–32.

Saito Y, Sato N, Hirashima M, Takebe G, Nagasawa S, Takahashi K. "Domain structure of bi-functional selenoprotein P". *Biochem J.* 2004; 381(Pt 3):841-6.

Sánchez-Losada LG, Tapia E, Bautista-García P, Soto V, Avila-Casado C, Vega-Campos IP, Nakagawa T, Zhao L, Franco M, Johnson RJ. "Effects of febuxostat on metabolic and renal alterations in rats with fructose-induced metabolic syndrome". *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008; 294(4): F710–18.

Sanhueza L, Concha L, Durruty P, Rubio C, Wolff C, García de los Ríos M. "Type 1 Diabetics patients carriers of metabolic syndrome: quantification of insulin resistance". *Rev. chil. endocrinol. diabetes* 2014; (3)

Schomburg, L.; Köhrle, J. "On the importance of selenium and iodine metabolism for thyroid hormone biosynthesis and human health". *Mol. Nutr. Food Res.* 2008; 52, 1235–1246.

Seale LA, Hashimoto AC, Kurokawa S, Gilman CL, Seyedali A, Bellinger FP, Raman AV, Berry MJ. "Disruption of the selenocysteine lyase-mediated selenium recycling pathway leads to metabolic syndrome in mice". *Mol Cell Biol.* 2012; 32(20):4141-54.

Serrano Ríos M, Cascales Angosto M. "Resistencia a la insulina, inflamación y obesidad." *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 2015.

Sloboda DM, Li M, Patel R, Clayton ZE, Yap C, Vickers MH. "Early life exposure to fructose and offspring phenotype: implications for long term metabolic homeostasis". *J Obes.* 2014; 2014:203474.

Sonntag AG, Dalle Pezze P, Shanley DP, Thedieck K. "A modelling-experimental approach reveals insulin receptor substrate (IRS)-dependent regulation of adenosine monophosphate-dependent kinase (AMPK) by insulin". *FEBS J.* 2012; 279(18):3314-28.

Sreeja S, Geetha R, Priyadarshini E, Bhavani K, Anuradha CV. "Substitution of soy protein for casein prevents oxidative modification and inflammatory response induced in rats fed high fructose diet". *ISRN Inflamm.* 2014; 2014:641096.

- Stapleton SR. "Selenium: an insulin-mimetic". *Cell Mol Life Sci.* 2000; 57(13-14):1874-9
- Steinbrenner H, Speckmann B, Pinto A, Sies H. "High selenium intake and increased diabetes risk: experimental evidence for interplay between selenium and carbohydrate metabolism". *J Clin Biochem Nutr.* 2011; 48(1):40-5.
- Steinbrenner H. "Interference of selenium and selenoproteins with the insulin-regulated carbohydrate and lipid metabolism". *Free Radic Biol Med.* 2013; 65:1538-47.
- Stocker R, Keaney JF Jr. "Role of oxidative modifications in atherosclerosis". *Physiol Rev.* 2004; 84(4):1381-478.
- Stranges S, Marshall JR, Natarajan R, Donahue RP, Trevisan M, Combs GF, Cappuccio FP, Ceriello A, Reid ME. "Effects of long-term selenium supplementation on the incidence of type 2 diabetes: a randomized trial". *Ann Intern Med.* 2007;147(4):217-23.
- Stuebe AM. "Does breastfeeding prevent the metabolic syndrome, or does the metabolic syndrome prevent breastfeeding?". *Semin Perinatol.* 2015; 39(4):290-5.
- Stump CS, Henriksen EJ, Wei Y, Sowers JR. "The metabolic syndrome: role of skeletal muscle metabolism". *Ann Med.* 2006; 38(6):389-402.

I

- Tain YL, Leu S, Wu KL, Lee WC, Chan JY. "Melatonin prevents maternal fructose intake-induced programmed hypertension in the offspring: roles of nitric oxide and arachidonic acid metabolites". *J Pineal Res.* 2014; 57(1):80-9.
- Tain YL, Wu KL, Lee WC, Leu S, Chan JY. "Maternal fructose-intake-induced renal programming in adult male offspring". *J Nutr Biochem.* 2015; 26(6):642-50.
- Takayama H, Misu H, Iwama H, Chikamoto K, Saito Y, Murao K, Teraguchi A, Lan F, Kikuchi A, Saito R, Tajima N, Shirasaki T, Matsugo S, Miyamoto K, Kaneko S, Takamura T. "Metformin suppresses expression of the selenoprotein P gene via an AMP-activated kinase (AMPK)/FoxO3a pathway in H4IIEC3 hepatocytes". *J Biol Chem.* 2014; 289(1):335-45.
- Tanti JF, Jager J. "Cellular mechanisms of insulin resistance: role of stress-regulated serine kinases and insulin receptor substrates (IRS) serine phosphorylation". *Curr Opin Pharmacol.* 2009; 9(6):753-62.
- Tappy L, Lê KA. "Does fructose consumption contribute to non-alcoholic fatty liver disease?". *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2012.

V

- Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. "Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence". *Mol Cell Biochem.* 2004; 266(1-2): 37-56.

- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer". *Chem Biol Interact.* 2006; 160: 1-40.
- Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura, JBF, Manfredi V, Benfato MS, Kubota LT. "Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação". *Quim Nova.* 2007; 30(5): 1323-38.
- Vendemiale G, Guerrieri F, Grattagliano I, Didonna D, Muolo L, Altomare E. "Mitochondrial oxidative phosphorylation and intracellular glutathione compartmentation during rat liver regeneration". *Hepatology*, 1995; 21:1450–1454.
- Vickers MH, Clayton ZE, Yap C, Sloboda DM. Maternal fructose intake during pregnancy and lactation alters placental growth and leads to sex-specific changes in fetal and neonatal endocrine function. *Endocrinology*. 2011; 152(4):1378–1387.
- Viollet B, Andreelli F. "AMP-activated protein kinase and metabolic control". *Handb Exp Pharmacol.* 2011; (203):303-30.
- Vogt M C., Brüning J.C. "CNS insulin signaling in the control of energy homeostasis and glucose metabolism – from embryo to old age" *Trends in Endocrinology and Metabolism* February 2013; Vol. 24, No. 2

W

- Wang X, Zhang W, Chen H, Liao N, Wang Z, Zhang X, Hai C. "High selenium impairs hepatic insulin sensitivity through opposite regulation of ROS". *Toxicol Lett.* 2014; 224(1):16-23.
- Worthington DJ, Rosemeyer MH. "Human glutathione reductase: purification of the crystalline enzyme from erythrocytes". *Eur J Biochem* 1974; 48:167-77.

X

- Xiao X, Yuan D, Wang YX, Zhan XA. "The Protective Effects of Different Sources of Maternal Selenium on Oxidative Stressed Chick Embryo Liver". *Biol Trace Elem Res.* 2015.
- Xu TJ, Yuan BX, Zou YM. "Effect of combination of insulin and selenium on insulin signal transduction in cardiac muscle of STZ-induced diabetic rats". *Yao Xue Xue Bao.* 2011 ;46(3):274-9.

Y

- Yan LJ. "Positive oxidative stress in aging and aging-related disease tolerance". *Redox Biol.* 2014; 2C:165-169.
- Yang SJ, Hwang SY, Choi HY, Yoo HJ, Seo JA, Kim SG, Kim NH, Baik SH, Choi DS, Choi KM. "Serum selenoprotein P levels in patients with type 2 diabetes and prediabetes: implications for insulin resistance, inflammation, and atherosclerosis". *J Clin Endocrinol Metab.* 2011; 96(8):E1325-29.

Yubero-Serrano EM, Delgado-Lista J, Peña-Orihuela P, Perez-Martinez P, Fuentes F, Marin C, Tunek I, Tinahones FJ, Perez-Jimenez F, Roche HM, Lopez-Miranda J. "Oxidative stress is associated with the number of components of metabolic syndrome: LIPGENE study". *Exp Mol Med*. 2013; 21:45:e28.

Yuan Z, Xu X, Ye H, Jin L, Zhang X, Zhu Y. "High levels of plasma selenium are associated with metabolic syndrome and elevated fasting plasma glucose in a Chinese population: A case-control study". *J Trace Elem Med Biol*. 2015; 32:189-94.

Z

Zhai L, Ballinger SW, Messina JL. "Role of reactive oxygen species in injury-induced insulin resistance". *Mol Endocrinol*. 2011;25(3):492-502.

Zeng MS, Li X, Liu Y, Zhao H, Zhou JC, Li K, Huang JQ, Sun LH, Tang JY, Xia XJ, Wang KN, Lei XG. "A high-selenium diet induces insulin resistance in gestating rats and their offspring". *Free Radic Biol Med*. 2012; 52(8):1335-42.

Zhou J, Huang K, Lei XG. "Selenium and diabetes--evidence from animal studies". *Free Radic Biol Med*. 2013; 65:1548-56.

Zimmet P, Alberti KG, Kaufman F, Tajima N, Silink M, Arslanian S, Wong G, Bennett P, Shaw J, Caprio S; IDF Consensus Group. "The metabolic syndrome in children and adolescents - an IDF consensus report". *Pediatr Diabetes*. 2007; (5):299-306.

Zou M, Arentson EJ, Teegarden D, Koser SL, Onyskow L, Donkin SS. "Fructose consumption during pregnancy and lactation induces fatty liver and glucose intolerance in rats". *Nutr Res*. 2012; 32(8):588-98.



FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

GRUPO ÁCIDO FÓLICO Y ALCOHOL